

**EINFLUSS NATÜRLICHER UND SYNTHETISCHER
NUKLEINSÄUREN AUF DIE IMMUNREAKTION**

Hans-Werner Sollinger

1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung an der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel

EINFLUSS NATÜRLICHER UND SYNTHETISCHER
NUKLEINSÄUREN AUF DIE IMMUNREAKTION

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hans-Werner Sollinger

aus

München

1 9 7 5

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Brendel

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 7. 1975



INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

2. KAPITEL I: DIE ELTERN

1. Die Eltern als Vorbild
2. Die Eltern als Stütze
3. Die Eltern als Berater
4. Die Eltern als Helfer
5. Die Eltern als Richter
6. Die Eltern als Zeugen
7. Die Eltern als Richter
8. Die Eltern als Zeugen
9. Die Eltern als Richter
10. Die Eltern als Zeugen
11. Die Eltern als Richter
12. Die Eltern als Zeugen
13. Die Eltern als Richter
14. Die Eltern als Zeugen
15. Die Eltern als Richter
16. Die Eltern als Zeugen
17. Die Eltern als Richter
18. Die Eltern als Zeugen
19. Die Eltern als Richter
20. Die Eltern als Zeugen

IN DANKBARKEIT

MEINEN ELTERN GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

SEITE

A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL und METHODEN	3
1. Allogene Hauttransplantation bei Ratten	3
2. Verwendete Nukleinsäuren	7
3. Nukleasebehandlung	9
4. Transplantation fetaler Kalbshaut	13
5. Perfusion von Rattennieren an einer Herz-Lungen-Maschine	15
6. Markierung und Extraktion von Ribonukleinsäuren aus E. Coli	20
7. Autoradiographische und histologische Technik	23
8. Extrakorporale Perfusion von Rattennieren mit Hundeblut	27
9. Quantifizierung der graft-versus-host Reaktion	29
10. Herstellung eines Ratten-Anti-Thymocytenserums aus Ziegen	33
11. Wirkung synthetische Polynukleotide auf die Überlebenszeit von allogenen Hauttransplantaten	34
12. Bestimmung der Anzahl antikörperbildender Zellen	36
13. Transplantation von Tumoren	40
14. Bestimmung der Leukocyten und Lymphocyten aus dem peripheren Blut	41
15. Statistische Berechnungen	41
C ERGEBNISSE	43
TEIL A. WIRKUNG NATÜRLICHER NUKLEINSÄUREN	42
1. Einfluß von natürlichen Nukleinsäuren auf die Überlebenszeit von allogenen Hauttransplantaten bei der Ratte	43

2. Einfluß von natürlichen Nukleinsäuren auf die Überlebenszeit von Xenotransplantaten	49
3. Histologische Befunde bei der Abstoßungsreaktion von fetaler Kalbshaut	52
4. Einfluß von RNA auf die Funktionszeit von extrakorporal perfundierten Rattennieren	57
5. Untersuchungen über die Aufnahme xenogener Ribonukleinsäuren in extrakorporal perfundierte Rattennieren	60
6. Beeinflussung der graft-versus-host Reaktion durch natürliche Ribonukleinsäuren	64

TEIL B. WIRKUNG SYNTHETISCHER NUKLEINSÄUREN 67

1. Einfluß von synthetischen Polynukleotiden auf die Überlebenszeit von allogenen Hauttransplantaten	68
2. Einfluß von synthetischen Polynukleotiden auf die graft-versus-host Reaktion	71
3. Einfluß von synthetischen Polynukleotiden auf die Antikörperbildung gegen T Zell abhängige Antigene	76
4. Untersuchung der Abhängigkeit der Antikörperbildung gegen T Zell abhängige Antigene vom Interdrüsenpiegel	79
5. Tumorstadium unter der Behandlung mit synthetischen Polynukleotiden	84

D. DISKUSSION ZUM TEIL A

1. Verlängerung der Überlebenszeit allogener Hauttransplantate durch Nukleinsäurebehandlung.	85
--	----

2. Einfluß der Nukleasebehandlung	88
3. Einfluß der Behandlung mit Protamin-sulfat	89
4. Besprechung der Wirkung natürlicher Ribonukleinsäuren in xenogenen Systemen	90
5. Aufnahme radioaktiv markierter Ribonukleinsäuren in extrakorporal perfundierte Rattennieren.	94
6. Wirkung natürlicher Nukleinsäuren auf die graft-versus-host Reaktion	96
7. Zusammenfassende Darstellung der immunsuppressiven Wirkung von natürlichen Nukleinsäuren.	101
E. DISKUSSION ZUM TEIL B	106
1. Einfluß von synthetischen Polynukleotiden auf die Immunantwort	106
2. Wirkung synthetischer Polynukleotide auf die allogene Transplantatreaktion	108
3. Steigerung der graft-versus-host Reaktion durch synthetische Polynukleotide	112
4. Antikörperbildung gegen T Zell abhängige Antigene	115
5. Beeinflussung des Wachstums von malignen Tumoren durch synthetische Polynukleotide	118
F. ZUSAMMENFASSUNG UND VERGLEICHENDE DARSTELLUNG DER WIRKUNGEN SYNTHETISCHER NATÜRLICHER NUKLEINSÄUREN	122
G. DANKSAGUNG	131
H. LEBENSLAUF	132

A. E I N L E I T U N G

Vereinfachend ausgedrückt sind es immer zwei Wirkungen, welche das Interesse der immunologischen Forschung wecken: Einmal der immunsuppressive Effekt einer Substanz, welcher für die Therapie von Patienten nach Organtransplantation oder bei Autoaggressionskrankheiten bedeutungsvoll ist, zum anderen die Möglichkeit, die Immunreaktion zu verstärken, was beispielsweise für die immunologische Tumorabwehr angestrebt wird.

Nukleinsäuren werden beide Wirkungen zugeschrieben. Es liegen Arbeiten vor, wonach Nukleinsäuren (DNA und RNA) die Immunreaktion sowohl verstärken, als auch hemmen können. Dabei wirken natürliche Nukleinsäuren immunsuppressiv während synthetische Nukleinsäuren immunstimulativ sind. Es besteht im Augenblick völlige Unklarheit darüber, welche Mechanismen für die eine oder andere Wirkung verantwortlich sind.

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zu diesen, den Nukleinsäuren zugeschriebenen Wirkungen liefern. Dabei war primär daran gedacht, die Wirkungen von natürlichen und synthetischen Nukleinsäuren unmittelbar zu vergleichen. Im Verlauf der sich über mehrere Jahre erstreckenden Untersuchungen ergaben sich jedoch hinsichtlich der Wirkungsweise dieser Substanzen mehrmals neue Aspekte, welche das ursprüngliche Programm drängten oder erweiterten. So entstand eine Serie von Untersuchungen, die nicht immer einen direkten Vergleich zwischen natürlichen und synthetischen Nukleinsäuren gestattet. Trotzdem wurden alle Ergebnisse in

diese Arbeit miteinbezogen, weil sie zusätzliche Informationen über die komplexe Wirkung von Nukleinsäuren liefern, die bisher nicht bekannt waren.

Folgende Fragen wurden bezüglich der Wirkung von natürlichen Nukleinsäuren gestellt:

1. Ist der immunsuppressive Effekt von natürlichen Nukleinsäuren abhängig von der Herkunft aus dem Spender oder Empfänger?
2. Haben auch Bruchstücke von natürlichen Nukleinsäuren immunsuppressive Wirkung?
3. Sind natürliche Nukleinsäuren in der Lage, die hyperakute, ausschließlich durch Antikörper induzierte Abstoßung zu verzögern?
4. Ist die immunsuppressive Wirkung durch einen zentralen Einfluß auf das Immunsystem bedingt, oder handelt es sich um eine lokale Wirkung im Sinne einer Transplantatkonditionierung?

Die Fragestellungen zur Wirkung von synthetischen Polynukleotiden waren folgende:

1. Wie ist der Einfluß von synthetischen Polynukleotiden auf die allogene Abstoßungsreaktion im Vergleich zu natürlichen Nukleinsäuren?
2. Haben synthetische Polynukleotide einen zentralen Einfluß auf die Immunreaktion?
3. Kann die Adjuvanswirkung von synthetischen Polynukleotiden auf eine Aktivierung von thymusabhängigen Immunreaktionen zurückgeführt werden?

B. MATERIAL UND METHODEN.

Allogene Hauttransplantation bei Ratten.

Als Empfänger wurden 200-300 g schwere, männliche Sprague-Dawley Ratten (Tierzucht Bäumler, Wolfratshausen) verwendet. Als Spender dienten männliche BD-6 Ratten (eigene Tierhaltung) gleichen Gewichts. Die Tiere wurden mit Chloralhydrat (360 mg/kg) intraperitoneal narkotisiert. Nach dem Rasieren der Rückenpartie und Behandlung mit einer Enthaarungscreme, wurden beim Empfängertier mit einer Hautstanze zwei runde Vollhautstücke ausgeschnitten. Auf die gleiche Weise wurde die Spenderhaut gewonnen. Nach dem Entfernen der Subcutis, sowohl beim autologen als auch beim allogenen Vollhautstück, wurden diese auf der Rückenpartie des Empfängers in die vorgestanzten Löcher eingelegt und mit Histoacryl N (Firma Braun-Melsungen) adaptiert. Das autologe Transplantat diente als technische Kontrolle. Ein Transplantat wurde als abgestoßen bezeichnet, wenn mehr als 90 % der Oberfläche eingetrocknet waren.

Inkubation der Hauttransplantate.

Die Transplantate wurden bei Zimmertemperatur in Plastikpetrischalen inkubiert. Pro 10 ml Inkubationsmedium wurden 5 Hauttransplantate eingelegt. Die Inkubationsdauer betrug in allen Versuchsgruppen 3 Stunden. Nach Beendigung der In-

kubation wurde sofort mit der Transplantation begonnen. Die Zusammensetzung des Inkubationsmedium wird in den einzelnen Versuchsgruppen beschrieben. Pro Injektion wurden allen Versuchstieren 1 mg Nukleinsäure gelöst in 1 ml Kochsalzlösung.

Gruppeneinteilung.

In allen Gruppen in denen die Hauttransplantate in Nukleinsäuren inkubiert wurden, war die Konzentration des Inkubationsmediums auf 1 mg Nukleinsäure pro 1 ml physiologische Kochsalzlösung eingestellt. In Gruppe 18-21 wurde pro ml Inkubationsmedium 0,1 mg Protaminsulfat hinzugefügt.

Gruppe 1: Inkubation des Hauttransplantates für 3 Stunden in physiologischer Kochsalzlösung.

Gruppe 2: Inkubation in Bierhefe-RNA.

Gruppe 3: Inkubation in Bierhefe-RNA, Injektion von je 1 mg Bierhefe-RNA an den Tagen 1,3,5 nach Transplantation intraperitoneal.

Gruppe 4: Inkubation in Bäckerhefe-RNA.

Gruppe 5: Inkubation in Bäckerhefe-RNA, Injektion von je 1 mg Bäckerhefe-RNA an den Tagen 1,3,5 nach Transplantation intraperitoneal.

Gruppe 6: Inkubation in Kalbsthymus-DNA.

Gruppe 7: Inkubation in Kalbsthymus-DNA, Injektion von 1 mg Kalbsthymus-DNA an den Tagen 1,3,5 nach Transplantation intraperitoneal.

Gruppe 8: Inkubation in Kalbs-RNA.

Gruppe 9: Inkubation in Kalbs-RNA, Injektion von je 1 mg Kalbs-RNA an den Tagen 1,3,5 intraperitoneal.

In Gruppe 10 - 17 wurde pro ml Inkubationsmedium (1 mg Nukleinsäure / 1 ml Kochsalzlösung) 0,1 mg Ribonuklease bzw. Desoxyribonuklease vor Inkubationsbeginn hinzugefügt. Die zur intraperitonealen Injektion verwendeten Nukleinsäuren wurden ebenfalls mit 0,1 mg Nukleasen versetzt.

Gruppe 10: Inkubation in Bierhefe-RNA und Ribonuklease.

Gruppe 11: Inkubation in Bierhefe-RNA und Ribonuklease, Injektion von Bierhefe-RNA und Ribonuklease an den Tagen 1,3,5 nach Transplantation intraperitoneal.

Gruppe 12: Inkubation in Bäckerhefe-RNA und Ribonuklease.

Gruppe 13: Inkubation in Bäckerhefe-RNA und Ribonuklease, Injektion von Bäckerhefe-RNA und Ribonuklease an den Tagen 1,3,5 nach Transplantation intraperitoneal.

Gruppe 14: Inkubation in Kalbsthymus-DNA und Desoxyribonuklease.

Gruppe 15: Inkubation in Kalbsthymus-DNA und Desoxyribonuklease
Injektion von Kalbsthymus-DNA und Desoxyribonuklease
an den Tagen 1,3,5 nach Transplantation intraperitoneal.

Gruppe 16: Inkubation in Kalbs-RNA und Ribonuklease.

Gruppe 17: Inkubation in Kalbsthymus-RNA und Ribonuklease,
Injektion von Kalbs-RNA und Ribonuklease an den
Tagen 1,3,5 nach Transplantation.

Gruppe 18-21 wurde pro ml Inkubationsmedium bzw. pro ml
Injektionslösung 0,1 mg Protaminsulfat hinzugefügt.

Gruppe 18: Inkubation in Bierhefe-RNA und Protaminsulfat,
Injektion von Bierhefe RNA und Protaminsulfat
an den Tagen 1,3,5 nach Transplantation intra-
peritoneal.

Gruppe 19: Inkubation in Bäckerhefe RNA und Protaminsulfat
Injektion von Bäckerhefe-RNA und Protaminsulfat
an den Tagen 1,3,5 nach Transplantation intra-
peritoneal.

Gruppe 20: Inkubation in Kalbsthymus-DNA und Protaminsulfat
Injektion von Kalbsthymus-DNA an den Tagen 1,3,5
nach Transplantation intraperitoneal.

Gruppe 21: Inkubation in Kalbs-RNA und Protaminsulfat, In-
jektion von Kalbs-RNA und Protaminsulfat an den
Tagen 1,3,5 nach Transplantation intraperitoneal.

In allen Versuchsgruppen wurden zehn Tiere als Empfänger ver-
wendet.

Verwendete Nukleinsäuren

1. Transfer Ribonukleinsäure aus Bäckerhefe (Fa.Boehringer Mannheim, Kat.-Nr. 15363).

2. Transfer Ribonukleinsäure aus Bierhefe (Fa. Boehringer Mannheim, Kat.-Nr. 15357).

3. RNA aus Organen fetaler Kälber

Herstellung aus Organen fetaler Kälber nach Schuster et al. (1964). Eine genaue Beschreibung der Methode findet sich in der Habilitationsschrift von H. Bohmert (Universität München, 1972).

Typische Analyse:	DNA	=	0 %
	RNA	=	30 %
	Protein	=	0,1 %
	Saccharide	=	67 %
	H ₂ O	=	3 %

4. Polyadenyl-Polyuridyl Säure (Poly A : Poly U)

(Fa. Boehringer, Mannheim, Kat.-Nr. 15461)

Die Substanz wurde ebenso wie Poly I:C als lyophilisiertes Pulver geliefert. In allen Versuchen wurden die Polynukleotide wie von der Herstellerfirma vorgeschrieben in 0,9 % NaCl aufgelöst.

5. Polyinosin-Polycytidyl Säure (Poly I : Poly C)

(Fa. Boehringer Mannheim, Kat.-Nr. 15474)

Dem internationalen Schriftum folgend wurden die Polynukleotide im Text als Poly I:C bzw. Poly A:U bezeichnet.

6. Desoxyribonukleinsäure (hochmolekular)

(Fa. Boehringer, Mannheim, Kat.-Nr. 15130).

Nukleasebehandlung

Ribonuklease

In Gruppe 10, 11, 12, 13, 16 und 17 wurde Ribonuklease aus Rinderpankreas verwendet (Fa. Boehringer Mannheim, Cat.-Nr.15331).

Die Substanz wurde als kristalliner Puder geliefert.

Die spezifische Aktivität betrug 40 Kunitzeinheiten/mg.

Eine Einheit wird als diejenige Enzymaktivität bezeichnet, welche die optische Dichte innerhalb einer Minute von E_0 auf E_1 senkt. Bei der Einwirkung der verwendeten RNase entstehen nach Angaben der Herstellerfirma Oligonukleotide. In einem geringen Prozentsatz (Harber, 1964) können auch Tri- und Dinukleotide gefunden werden.

Inkubationsvorgang

Die gewählte Konzentration an Ribonuklease betrug in allen Versuchen 0,1 mg pro 1 mg Ribonukleinsäure. Nach Siebert (1964) ist diese Konzentration ausreichend, um alle in der Kochsalzlösung vorhandenen Ribonukleinsäuremoleküle bei Zimmertemperatur in einem Zeitraum von 3 Stunden in Nukleotide aufzuspalten. In Gruppe 10, 11, 12, 13, 16 und 17 wurden 10 mg Kalbs-RNA in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst. Nach der Zugabe von 1 mg. Rinderpankreasribonuklease wurde das Gemisch für 10 Minuten vorsichtig geschüttelt und anschließend bei Zimmertemperatur 3 Stunden mit dem Hauttransplantat inkubiert. In einem Vorversuch wurde geprüft, ob die Aufspaltung der Ribonukleinsäuren bei den gewählten Versuchsbedingungen eintritt.

Versuchanordnung

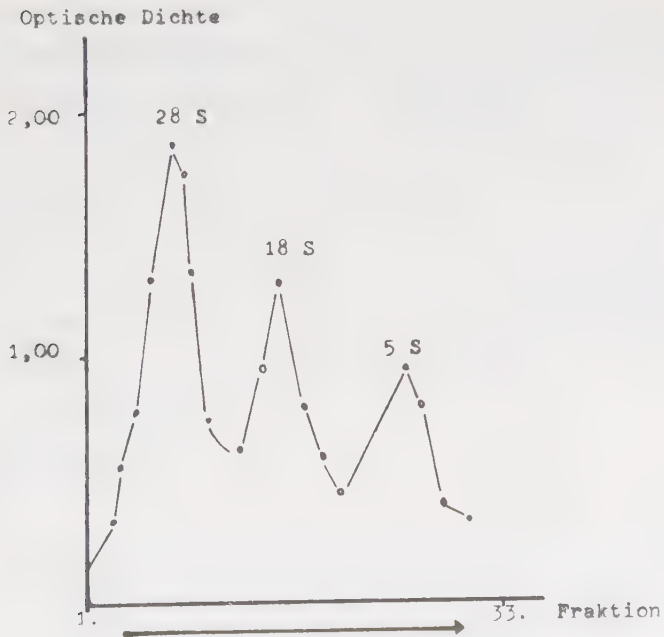
50 ug Kalbs-RNA wurde in 0,2 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung aufgelöst und auf einen linearen Saccharose Gradienten (5-30%) aufgebracht. Nach der Zentrifugation in einer präparativen Zentrifuge (Spinco Modell L, Rotor SW 39, dreieinhalb Stunden bei 35.000 UpM) wurde der Boden der Zentrifugengläser angestochen und 33 Fraktionen gesammelt. In jeder Fraktion wurde E 260 bestimmt. Hierbei wurden drei Maxima der optischen Dichte gemessen die anzeigen, daß 28 S, 18 S und 5 S Ribonukleinsäuren in der gesamten Präparation enthalten sind (Fig. 1). Nach der Behandlung mit Ribonuklease fand sich nur ein Maximum bei 2 S (Fig.2) was nach Colmerauer et al. (1973) zeigt, daß die Ribonukleinsäuren vollständig in Nukleotide aufgespalten sind. Identische Befunde wurden beim gleichen Vorgehen im Falle der Bäckerhefe-RNA und der Bierhefe-RNA erhalten.

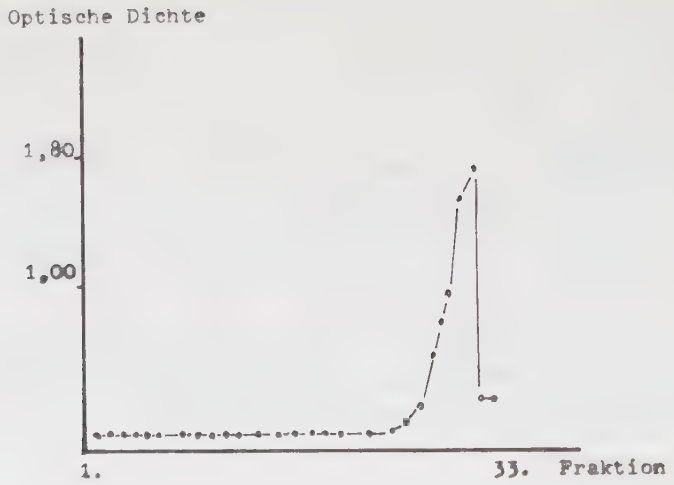
Desoxyribonuklease.

In Gruppe 14 und 15 wurde Deoxyribonuklease I aus Rinderpankreas verwendet (Fa. Boehringer Mannheim, Kat.Nr.15469). Die Substanz wurde als lyophilisiertes Pulver geliefert. Die spez. Aktivität betrug 2000 Kunitzeinheiten/mg. Nach Angaben der Herstellerfirma entstehen bei den gewählten Inkubationsbedingungen (siehe oben) 5-Oligonukleotide. Der Inkubationsvorgang entspricht dem für Ribonukleinsäuren. Pro mg Kalbsthymus-DNA wurde 0,1 mg DNase I hinzugefügt.

Vorversuch

Sedimentationsprofil von Kalbs-RNA (Saccharose Gradient 5-30%,
Rotor SW 39, 3,5 Stunden bei 35.000 UpM)





Sedimentationsprofil von Kalbs-RNA nach Behandlung mit
Pankreasribonuklease (3Std., 22°C)

Transplantation fetaler Kalbshaut.

Zur Gewinnung der fetalen Kalbshaut wurde der Uterus von frisch geschlachteten Kühen in intaktem Zustand im Schlachthof München entfernt. Tragsäcke (Uterus und Fet) wurden dann zu experimentellen Zwecken verwandt, wenn das Gewicht zwischen 10 und 20 kg lag. Innerhalb von 20 Minuten wurde der Fetus im Labor unter sterilen Bedingungen entnommen und die fetale Kalbshaut in einem Stück abgelöst. Aus dem Präparat wurden runde Hautstücke mit einem Durchmesser von 5 cm ausgeschnitten. Anschließend wurden die Hautstücke unter den unten angegebenen Bedingungen inkubiert. Als Empfängertiere fanden mischrassige Kaninchen (von verschiedenen lokalen Händlern) mit einem Körpergewicht von 2-3 kg Verwendung. Diesen Tieren wurde auf der seitlichen Rückenpartie ein rundes Vollhautstück mit einem Durchmesser von ca. 5 cm entnommen. Dabei auftretende Blutungen wurden mit einem Elektrokauter sorgfältig gestillt. Die Transplantate wurden mit Einzelknopfnähten befestigt und mit Histoacryl an den Wundrand des Empfängertieres adaptiert.

Gruppeneinteilung:

Gruppe 22: 40 Kaninchen erhielten fetale Hauttransplantate, wobei 20 Transplantate für 3 Stunden in Nukleinsäurelösung (1 mg Kalbs-RNA pro ml physiologischer Kochsalzlösung) inkubiert wurden. 20 Transplantate wurden in Kochsalzlösung inkubiert. Die Inkubation wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Gruppe 23: Die fetale Haut für 20 Transplantate wurde 24 Stunden bei 4° C im Kühlschrank konserviert. 10 Transplantate wurden 3 Stunden vor der Transplantation in Nukleinsäurelösung (wie Gruppe 22) bei Zimmertemperatur inkubiert. 10 Transplantate wurden bei gleicher Temperatur in Kochsalzlösung gelagert.

Um den Zustand der Transplantate zu überprüfen, wurden die Hauttransplantate ab dem 2. Tag nach der Transplantation, in zweitägigen Abständen einer visuellen und taktilen Inspektion unterzogen. Ein Hauttransplantat wurde als abgestoßen bezeichnet, wenn mehr als 90 % der Oberfläche eingetrocknet waren.

Biopsien zur histologischen Untersuchung wurden ebenfalls ab dem 2. Tag in zweitägigen Abständen entnommen und in 10 % phosphatgepuffertem Formalin fixiert. Die Bearbeitung und Auswertung der histologischen Präparate wurde von Herrn Prof. Dr. Petzoldt aus der Dermatologischen Klinik der Universität München vorgenommen.

Perfusion von Rattennieren an einer Herz-Lungen-Maschine für Ratten.

Perfusionslösung

Zur Perfusion der Rattennieren wurde die nach Vorschlägen von Larfiadér modifizierte "Perfusionslösung Dr. Fresenius" verwendet. In dieser Lösung sind enthalten:

Na ⁺		140 mval/l
Ka ⁺		7 mval/l
Ca ⁺⁺		5 mval/l
Mg ⁺⁺		3 mval/l
Cl ⁻		105 mval/l
CH ₃ COO ⁻	-----	50 mval/l
Mannit		0,5 g/l
Glukose		2,0 g/l
LMW-Dextran	...	50 g/l

Diese Basislösung hat eine Osmolarität von 320 mOsmol/l und hat aus Stabilitätsgründen erst kurz vor der Verwendung folgende Zusätze erhalten:

Xylocain 5 %	10 ml/l
Natriumbicarbonat	4,8 mval/l
Heparin	50 mg/l
Tris-Puffer 0,3 M	2-2,5 ml/l.

Durch den letztgenannten Zusatz wird die fertige Lösung auf einen pH von 7,29 bis 7,38 bei 5° C abgepuffert. Im folgenden wird diese Lösung als Standardperfusionslösung bezeichnet.

Perfusionssystem:

Das verwendete System besteht aus einer Rollerpumpe, einer Perfusionskammer und einem Kapillaroxygenator. Die A. renalis der exzidierten Niere wird auf einer feststehenden Kanüle (Nr. 1) befestigt, so daß das Organ an dem Gefäß frei in einer trichterförmigen Perfusionskammer hängt, in welcher sich das venöse Perfusat aus der breit eröffneten V. renalis sammelt. Die Kammer wird innerhalb einer doppelten Wandung mit temperiertem Wasser umströmt. Das Blut strömt per gravitatem aus dem venösen Reservoir in einen Kapillaroxygenator, welcher aus einem Bündel von 37 Silicon-Kautschukschläuchen besteht. Der Gasaustausch erfolgt gegen reinen Sauerstoff durch die Kapillarwände. Aus dem Oxygenator wird das Blut von einer Okklusiven Rollerpumpe abgesaugt (Hub: 0,07 ml/U) durch die Variation der Drehzahl kann das Perfusionsvolumen von 0,5 bis 4,5 ml/min. gesteuert werden.

Ein zwischen Rollerpumpe und A. renalis geschalteter Wärmeaustauscher bewirkt Temperaturkonstanz des Perfusionsmediums. Der Perfusionsdruck wurde an der arteriellen Kanüle über ein Statham-Element bestimmt.

Technische Details des Perfusionssystems sind in der Dissertationsarbeit von A. Schilling (Universität München, 1972) eingehend beschrieben.

Nephrektomie

Die Spendertiere (männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 200 - 300 g, Tierzucht Bäumler Wolfratshausen) wurden mit Chloralhydrat (360 mg/kg Körpergewicht) anaesthetisiert und die Bauchhöhle durch einen Mittelschnitt eröffnet. Der linke Ureter wurde freipräpariert und nach distaler Unterbindung und Incision mit einem Polyäthylkatheter (Intra-medie PE 10) kanüliert. Die linke Niere wurde freipräpariert, der Gefäßstiel dargestellt, das Organ unter Erhaltung eines Aortenpatches excidiert und in das Perfusionssystem gebracht. Kurz vor der Excision wurden 50 E Heparin in die Aorta injiziert.

Perfusionsvorgang bei der Perfusion mit radioaktiven Ribonukleinsäuren.

Sofort nach der Entnahme der Nieren erfolgte eine zehnminütige Perfusion mit der angegebenen Perfusionslösung ohne Zusatz von Ribonukleinsäuren durch Schwerkraft (70 mm/Hg). Das venöse Perfusat wurde in ein Becherglas abgeleitet. Anschließend wurde die Niere über einen Dreiwegehahn an das Perfusionssystem der Herz-Lungen-Maschine angeschlossen.

Das Perfusionssystem einschließlich des Reservoirs war bereits vor der Entnahme der Niere, mit der Perfusionslösung gefüllt worden.

Die Temperatur des Perfusates betrug während der gesamten Versuchsdauer 37° C. Die Zusammensetzung der Perfusionslösung ist in den einzelnen Gruppen beschrieben.

Nach dem Anschluß der Nieren an das Perfusionssystem der Herz-Lungen-Maschine, wurde das Perfusionsvolumen auf 5 ml/min. eingestellt. Die hierzu benötigten Druckwerte lagen zwischen 90 und 110 mm/Hg. Nach Beendigung der Perfusion an der Herz-Lungen-Maschine wurden alle Nieren 10 Minuten mittels Schwerkraft mit Standard-Perfusionslösung ohne Ribonukleinsäuren gespült.

Die Fixierung zur histologischen Auswertung erfolgte in Buinscher Lösung.

Gruppeneinteilung:

In allen Versuchsgruppen wurden zwei Nieren 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten mit nukleinsäurehaltiger Perfusionslösung perfundiert.

Gruppe 27: Perfusion mit 0,1 mg Coli-RNA/ml Standardperfusionslösung.

Gruppe 28: Perfusion mit 0,1 mg Coli-RNA und 0,01 Protaminsulfat/ml Standardperfusionslösung.

Gruppe 29: Perfusion mit 1 mg Coli-RNS/ml Standardperfusionslösung.

- Gruppe 30: Perfusion mit 1 mg Coli-RNA und 1 mg Protaminsulfat/ml Standardperfusionslösung.
- Gruppe 31: Perfusion mit 1 mg Coli-RNA/ml Standardperfusionslösung, den Versuchstieren wurde 24 Stunden vor Versuchsbeginn 1 mg Protaminsulfat intravenös injiziert.
- Gruppe 32: 1 mg nichtradioaktivmarkierte Bierhefe RNA/ml Standardperfusionslösung.

Markierung und Extraktion von Ribonukleinsäuren aus E.Coli.

Das Nährmedium zur Bakterienzucht setzt sich wie folgt zusammen:

Pepton 10 g/lFrazer-Lösung 50 ml/l

Bestandteile: 1 g Gelatine, 3,3 g CaCl_2 (ohne H_2O),
 100 g NH_4Cl , Mg SO_4 (ohne H_2O),
 2,51 H_2O , 2,5 l Glyzerin.

Phosphormix 30 ml/l

Bestandteile: 1480 g Na_2HPO_4 (2 H_2O), 115 g KH_2PO_4

Glukose 5 g/l

Die Aufzucht der Bakterien hat unter absolut sterilen Kautelen zu erfolgen. Laborgerät sowie die Bestandteile des Nährmediums sind einen Tag vor Gebrauch zu autoklavieren. Hierbei ist darauf zu achten, daß die Glukose und der Phosphormix getrennt voneinander autoklaviert werden.

Um besonders frische teilungsfähige Bakterien zu erhalten, wurden 10^6 Bakterien für 12 Stunden in einem Liter Nährmedium bei 37°C ausgesetzt. In dieser sog. "Übernachtskultur"

wachsen ca. 3×10^8 frische Bakterien heran. Als Isotop zur Markierung von RNA wird Uracil verwendet, da es als einziger von fünf möglichen Basenresten, welche in den Nukleinsäuren vorkommen, nur in RNA eingebaut wird und somit gesichert ist, daß nur RNA und nicht auch DNA Moleküle markiert werden. Radioaktiv wird das Uracil durch Anhängen eines Tritiumatoms in Stellung 6, was durch Dehalogenation von 6-Chlor-Uracil erreicht wird. Tritium ist ein β -Strahler und besitzt eine Halbwertszeit von 12 Jahren. Um eine möglichst starke Markierung der RNA zu erreichen, ist es nötig, das Isotop in der Zeitspanne zuzugeben, in welcher sich die Bakterien am stärksten vermehren. Dazu war es nötig, nach Übertragung der Übernachtskultur auf fünf Liter Nährmedium durch photometrische bestimmte Probeentnahmen eine Wachstumskurve aufzuzeichnen. Daraus ergab sich, daß das Isotop zugegeben werden mußte, wenn sich 10^4 Bakterien/ml im Medium befanden. Bei 10^8 /ml wurde das Wachstum durch Abkühlung im Eisbad unterbrochen und der Extraktionsprozeß begonnen.

Die Extraktion von Coli-RNA wurde nach Bolle et al., (1968) durchgeführt. In einem ersten Schritt erhält man durch Abzentrifugieren des Nährmediums bei 3000 UpM (IVKS Christ) bei 4°C für 60 Minuten einen festen, pastenähnlichen Bodensatz aus ca. 50 g Bakterien, (Naßgewicht); dieser wird rasch mit flüssiger Luft auf -60°C abgekühlt, um die Bakterienmembranen aufzubrechen. Darauf erfolgt die Resuspension in Puffer

(0,01 M NaCl, 0,01 M Tris) und die Zugabe von 200 g Lysozym, (15000 E/mg Merck No. & 281 LAB). Einem erneuten Einfrieren folgt beim Wiederauftauen die Zugabe von Sodiumdodecylsulfat. Durch leichtes Erwärmen wird die trübe visköse Masse geklärt, und mit 0,1 M Sodiumacetat ein gleiches Volumen von wasser-gesättigtem Phenol zugefügt. Die Mischung wird unter Rühren bei 68° C für 30 Minuten einer ersten Extraktion ausgesetzt. Nach einem zweimaligen Zentrifugieren bei 4° C und 20.000 UpM (Runne Labor Zentrifuge) wird der dekantierte Überstand mit 2,5 Vol. absolutem Alkohol versetzt und das Präzipitat in 150 ml 0,01 M Tris-Puffer aufgenommen. Die Pronase Verdauung erfolgt für 60 Minuten bei 37° C. Die Konzentration der Pronase soll 1 mg/ml betragen. Nach der Zugabe des Ribonukleasehemmers Bentonit (1 mg/ml), erfolgt ein erneutes zweimaliges phenolisieren und zentrifugieren. Anschließend werden durch mehrmalige Waschvorgänge in 75 % Alkohol, absolutem Alkohol und Äther Protein und Phenolrückstände entfernt. Durch Trocknen im Heißluftschrank bei 60° C wird endgültig das weiße, pulvrige Material dargestellt. Durch Szintillationszählung konnte eine Aktivität von 20.000 cpm pro 10 RNA_y gemessen werden.

Autoradiographische und histologische Technik.

Zur histologischen und autoradiographischen Bearbeitung bedienen wir uns weitgehend standardisierter Techniken. Im folgenden seien deshalb noch einmal in Kurzform die wesentlichen Schritte aufgezeichnet.

- 1.) Fixierung der Nieren sofort nach der extrakorporalen Perfusion in Buinscher Lösung.
- 2.) Einbettung in Paraffin.
- 3.) Anfertigen der Schnitte von 3 - 5 μ Dicke.
- 4.) Präparation der Objektträger mit einer Lösung aus 0,5 % Gelatine und 0,05 % Chromalaun.
- 5.) Auflegen von Kodak AR 10 Strippingfilm in der Dunkelkammer bei Rotlicht (Kodak Wrattenfilter Nr. 1, 25 Watt Birne).
- 6.) Trocknen der Präparate im kühlen Luftstrom.
- 7.) Aufbewahrung in Adam-Safe-Light Boxes bei 4°C unter Zusatz von wasserfreiem Calciumsulfat.

- 8.) Exposition je nach Serie über einen Zeitraum von
14 - 42 Tagen.
- 9.) Entwickeln der Präparate mit Kodak D-19 Entwickler⁺,
Entwicklungszeit 5 - 10 Minuten.
- 10.) Spülung zur Entfernung des Entwicklers.
- 11.) Fixation in Kodak-Fixierbad F-24 für 30 - 40 Minuten
bei 18 - 21° C.
- 12.) Auswaschen des Fixativs.
- 13.) Staubfrei trocknen.
14. Färbung.

⁺Kodak AR 10 Strippingfilm, Emulsionsdicke 5 u, Korndurchmesser 0,2 u, Gelatineschicht 10 u.

⁺Kodak D-19 Entwickler, 100 ml Aqua dest. auf 38° C erwärmen, 1,0 g Substanz A und 14,3 g Substanz B zugeben und unter ständigem Rühren vollständig lösen. Abkühlen auf 20° C.

Färbung der autoradiographischen Präparate.

PAS - Reaktion nach Autoradiographie (modifiziert nach
Deimling et al.)

- 1.) Filme nach Fixierung gut trocknen lassen.
 - 2.) Trocknen in einem dunklen Raum, in 0,1 % Goldchloridlösung einlegen.
 - 3.) Waschen in 1 n HCl 30 min. Alle 5 Minuten wechseln, bis keine Gelbfärbung mehr sichtbar.
 - 4.) Waschen unter fließendem Wasser, Spülung mit Aqua dest.
 - 5.) 10 Minuten in 0,5 % Perchlorsäure.
 - 6.) 5 Minuten Fließwasser.
 - 7.) 20 Minuten Schiffssches Reagenz
 - 8.) 3 x 5 Minuten SO_2 -Wasser.
 - 9.) 15 Minuten Fließwasser.
 - 10.) Trocknen lassen. Eindecken mit Glycerin-Gelatine.
- Gesamtdauer 5 Stunden.

Färben zur Silberkornzählung

(Dörmer, pers. Mitteilung).

- 1.) 15 Minuten Hämalan.
- 2.) Sofort trocknen lassen.
- 3.) Differenzieren auf Sicht mit 96 Teile 70 % Alkohol und
4 Teile 1 N HCl.
- 4.) Trocknen
- 5.) Fließwasser 10 Minuten.
- 6.) Trocknen.
- 7.) Kein Deckglas.

⁺Kodak Fixierbad F-24:

50 ml Aqua dest. auf 50° C erwärmen. Zugabe von 24,0 g Natriumthiosulfat p.a. 1,0 g Natriumsulfit krist. p.a. (wasserfrei), 2,5 g Natriumdisulfit p.a., 50 ml a.dest.

Bei der Herstellung und Begutachtung der autoradiographischen Präparate waren Herr Dr. W. Köhl und Frau Inge Köhl vom Anatomischen Institut der Universität München behilflich.

Extrakorporale Perfusion von Rattennieren mit Hundeblut.

Die Gründe die zur Wahl dieses Versuchsmodells führten, werden in der Diskussion beschrieben.

Das Perfusionssystem, sowie die Nephrektomie wurde bereits in den vorangehenden Teilen erläutert. Bei der Perfusion von Rattennieren dienten die vorausgegangenen Untersuchungen von Land et al (1972) und die Dissertationsarbeit von A.Schilling (1972) als Grundlage. Einzelheiten des Perfusionsvorganges werden in der oben genannten Dissertation beschrieben. Wesentliche Punkte werden in Kürze noch einmal dargestellt.

Grundsätzliches:

Bei Durchströmung der Rattennieren mit Blut von xenogenen Spendern, konnte von Land et al. (1971) gezeigt werden, daß es in vitro möglich ist, den Vorgang der hyperakuten xenogenen Abstoßung mit allen in-vivo Kriterien (rapider Anstieg des peripheren Widerstandes mit Sistieren der Blutdurchströmung innerhalb von 10 - 25 Minuten, Stauung und Hämorrhagie des Organs, Endothelnekrosen an den Glomerula und Arteriolen) zu simulieren.

Perfusionsvorgang

Nach der Nephrektomie wurden die Rattennieren in das Perfusionssystem gebracht und jeweils 30 Minuten vorperfundiert. In der

Gruppe 24 erfolgte die Vorperfusion mit Ringerlösung, in der Gruppe 25 mit Ringerlösung und fetaler Kalbs-RNA (1mgRNA/100ml Ringerlösung).

In der Gruppe 26 wurde pro ml des RNA-Ringer-Gemisches 0,1 mg Ribonuklease hinzugefügt und für 30 Minuten vor Beginn der Vorperfusion bei 37° C inkubiert.

Nach der Vorperfusion erfolgte die Zugabe von frisch entnommenem Hundeblut. Bei allen Versuchen diente der gleiche Bastardhund (Gewicht 23,5 kg) als Blutspender. Um das Vollblut auf einen Hämatokrit von 25 einzustellen, wurde mit entsprechenden Mengen von Ringerlösung verdünnt. Durch Zugabe von Natriumbikarbonat bzw. 1/10 n Salzsäure wurde der pH-Wert des Blutes konstant zwischen 7,2 und 7,4 gehalten.

Die Perfusionstemperatur betrug 37° C. Perfusionsdruck und Perfusionsvolumen, wurden kontinuierlich bestimmt. Die Versuche wurden abgebrochen, wenn das Perfusionsvolumen unter 0,5 ml/gx min fiel. Dieser Zeitpunkt wurde auch als Abstoßungszeitpunkt des Transplantates definiert. Pro Versuchsgruppe wurden zehn Nieren perfundiert. Nach Beendigung des Versuches wurde die während der Perfusion produzierte Urinmenge bestimmt.

Quantifizierung der "graft-versus-host"-Reaktion.

Die graft-versus-host Reaktion ist eine ausschließlich T Zell abhängige Reaktion (siehe Diskussion). Die exakteste Methode zu ihrer Quantifizierung in vivo ist das von Simonsen 1963 angegebene Testsystem. Hierbei werden Mäusen F-1 Hybriden parentale Milzzellen intraperitoneal übertragen. Die anschließende Proliferation von Milzzellen gegen die genetisch differenten F-1 Zellen drückt sich in einer Zunahme des Milzgewichtes aus. In der vorliegenden Arbeit wurden C3H x DBA/J2 F-1 Hybriden verwendet. Parentale Zellen wurden von C3H Muttertieren übertragen. Hierbei wurden drei verschiedene Zellmengen (2×10^6 , 5×10^6 , 8×10^6) injiziert. Die Zunahme des Milzgewichtes wurde durch den sog. Milzindex (Milzgewicht:Körpergewicht: unbehandelte Tiere / Milzgewicht/Körpergewicht: behandelte Tiere) ausgedrückt. Die Übertragung der Zellen erfolgte bei allen F-1 Hybriden am 4. Lebenstag.

Versuchstiere.

Weibliche C3H Mäuse und männliche DBA/J2 Mäuse mit einem Gewicht zwischen 15 und 20 g wurden vom Max-Planck-Institut in Martinsried bezogen. Die Tiere wurden in den Tierställen des Inst. f. Chir. Forschung gepaart. In allen Versuchen wurden männliche und weibliche F-1 Hybriden verwendet.

Gruppeneinteilung und Versuchsprotokoll

Natürliche Ribonukleinsäuren

Gruppe 33:

Weiblichen C3H Mäusen wurde 24 Stunden vor der Entnahme der Milzzellen 1 mg Kalbs-RNA gelöst in 1 ml Kochsalzlösung i.p. injiziert. Nach der Entnahme der Milzen wurde eine Zellsuspension aufbereitet und die Zellen 3 x in Hankscher Lösung gewaschen und die jeweilige Zellzahl (2×10^6 , 5×10^6 , 8×10^6) auf 0,1 ml Hanksche Lösung eingestellt. Jeweils 15 F-1 Hybriden wurde die gleiche Zellzahl injiziert. Die Differenz zu den im Ergebnisteil angegebenen Zahlen ist darauf zurückzuführen, daß ein Teil der Tiere nach der Injektion vom Muttertier nicht mehr angenommen wurde und starb. In den Kontrollgruppen wurden den F-1 Hybriden gleiche Zellzahlen von C3H-Mäuse injiziert, denen 24 Stunden vor der Entnahme der Milzzellen 1 ml Kochsalzlösung i.p. gespritzt worden war.

Gruppe 34:

Milzzellen von unbehandelten C3H Mäusen wurden 3 Stunden in RNA-Lösung (1mg Kalbs-RNA/ml Hankscher Lösung) inkubiert und nach Resuspension injiziert. Die Zellen der Kontrollgruppe wurden 3 Stunden in Hankscher Lösung inkubiert. Anzahl der Zellen und der F-1 Hybriden entsprechen Gruppe 33.

Gruppe 35:

Milzzellen von unbehandelten C3H Mäusen wurden für 3 Stunden in RNA-Lösung (1mg Kalbs-RNA/ml Hankscher Lösung) inkubiert. Vor der Injektion wurden die Zellen resuspendiert und 3 x in Hankscher Lösung gewaschen. Die Zellen der Kontrollgruppe wurden 3 Stunden in Hankscher Lösung inkubiert und ebenfalls 3 x in Hankscher Lösung gewaschen. Zellzahlen und Anzahl der F-1 Hybriden entsprechen der Gruppe 33.

Alle F-1 Hybriden wurden am 9. Tag nach der Injektion durch Äthernarkose getötet und der Milzindex bestimmt.

Synthetische Nukleinsäuren

Um den Einfluß von synthetischen Polynukleotiden auf die graft-versus-host Reaktion zu testen wurde ebenfalls das oben beschriebene System verwendet.

Gruppe 36:

C3H Mäusen wurde 24 Stunden vor der Entnahme der Milzen 1000 ug Poly I:C injiziert. Die Milzzellen wurden nach der Entnahme der Milzen 3 x in Hankscher Lösung gewaschen und die entsprechenden Zellzahlen pro 0,1 ml Hankscher Lösung eingestellt. In der Kontrollgruppe wurden die Milzzellen von C3H-Mäusen verwendet, denen 24 Stunden vor der Entnahme der Milzen 0,1 ml Kochsalzlösung injiziert worden war. Zellen, behandelter und unbehandelter Tiere, wurden jeweils 45 F-1 Hybriden injiziert.

Gruppe 37:

C3H Mäusen wurde 24 Stunden vor der Entnahme der Milzen 1000 ug Poly A:U injiziert. Die Behandlung der Zellen und die Kontrollgruppe entsprechen der Gruppe 33.

Gruppe 38:

F-1 Hybriden n= 45 wurden je 50, 100 und 200 ug Poly A:U bzw. Poly I:C in die Bauchhöhle injiziert.

In allen Gruppen erfolgte die Tötung der F-1 Hybriden und die Bestimmung des Milzindex am 9. Tag nach der Injektion.

Herstellung eines Ratten-Anti-Thymocytenserums (RATS) aus Ziegen.

RATS wurde hergestellt durch Immunisierung von einer Ziege, mit Thymuszellen von 10 - 14 Wochen alten Sprague-Dawley Ratten. Das zur Immunisation verwendete Gewebe wurde nach medialer Thorakotomie sorgfältig entfernt, so daß nur minimale Blutungen der umgebenden Blutgefäße in den Thymus erfolgte. Die Immunisation der Ziegen wurde mit drei intravenösen Injektionen an den Tagen 1,3 und 5 begonnen, und durch vier intramuskuläre Injektionen unter Zusatz von komplettem Freund'schem Adjuvands an den Tagen 7, 14, 21 und 28 fortgesetzt. Bei jeder Injektion wurden 1×10^8 lebende (90%) und 10^7 tote Zellen (10%) verwendet. Sieben Tage nach der letzten Injektion der Zellen, wurden die Tiere durch Punktion der V. Jugularis geblutet. Das Serum wurde 3 x mit einem gleichen Volumen frischer Rattenerythrocyten gewaschen, um antierythrocytäre Antikörper zu entfernen. Nach der Absorption wurde das Serum 30 Minuten lang auf 56°C erhitzt, um das Komplement zu inaktivieren. Kleinere Mengen von 20 ml wurden getrennt abgefüllt und bei -20°C aufbewahrt. Nur eine einzige Charge des Antiserums wurde bei allen Hauttransplantationen verwendet.

Der Titer der lymphocytotoxischen Antikörper wurde nach der Methode von Kissmeyer-Nielsen bestimmt und betrug 1:164.

Hämagglutinierende Antikörper waren durch die Absorption vollständig entfernt worden.

Wirkung synthetischer Polynukleotide auf die Überlebenszeit
von allogenen Hauttransplantaten.

Die Technik der Hauttransplantation als auch die Versuchstiere wurden auf Seite beschrieben.

Gruppeneinteilung:

Kontrollgruppe: entspricht Gruppe 1 in Teil A (Seite)

Gruppe 39:

Inkubation der Hauttransplantate in einer Poly I:C haltigen Lösung. (1mg Poly I:C/ml physiologischer Kochsalzlösung) für 3 Stunden bei Raumtemperatur.

Gruppe 40:

Inkubation der Hauttransplantate wie in Gruppe 1. Zusätzliche Injektion von je 1 mg Poly I:C (gelöst in 1 ml Kochsalzlösung) an den Tagen 1,3,5 nach Transplantation intraperitoneal.

Gruppe 41:

Inkubation in einer Poly A:U haltigen Lösung. (1mg Poly A:U/ml Kochsalzlösung) für 3 Stunden bei Raumtemperatur.

Gruppe 42:

Inkubation der Hauttransplantate wie in Gruppe 3. Zusätzliche Injektion von je 1 mg Poly A:U an den Tagen 1,3,5 nach Transplantation.

Gruppe 43:

Injektion von 1 mg Poly I:C 12 Stunden vor der Transplantation.

Gruppe 44:

Injektion von 1 mg Poly A:U 12 Stunden vor der Transplantation.

Gruppe 45:

Injektion von 2 ml Antithymocytenserum und 1 mg Poly I:C in einer Mischspritze an den Tagen 1,3,5 nach Transplantation.

Gruppe 46:

Injektion von 2 ml Antithymocytenserum und 1 mg Poly A:U in einer Mischspritze an den Tagen 1,3,5 nach Transplantation.

Die Injektionen in Gruppe 3 - 8 erfolgten intraperitoneal.

In allen Gruppen wurden zehn Empfängertiere verwendet.

Bestimmung der Anzahl antikörperbildender Zellen.

Zur Bestimmung der Anzahl antikörperbildender Zellen wurden die Technik der lokalisierten Hämolyse im Gel nach Jerne und Nordin (1963) verwendet. In Abwandlung der Originalmethode verwendeten wir als Deckagar Sea Plaque Agarose (Marine Colloids). Diese Substanz geliert erst bei 35°C , was den Vorteil hat, daß das Agar-Zellgemisch nur auf ca. 37°C erhitzt werden muß und somit keine thermische Zerstörung der Zellen zu befürchten ist. Ferner besitzt Sea Plaque Agarose nur geringe antikomplementäre Eigenschaften, weshalb bereits geringe Mengen von DEAE-Dextran als Komplementschutz ausreichen. Als Testantigen wurden Schaferythrocyten verwendet.

- 1) Die Immunisierung der Mäuse erfolgte vier Tage vor dem Versuch mit 4×10^8 , 3 x gewaschenen Schaferythrocyten durch intraperitoneale Injektion.

- 2) Eine Plastikpetrischale wird am Tag vor dem Versuch mit 10 ml Bodenagar beschichtet. Die Zusammensetzung des Bodenagars besteht aus 1,4 g Agar purum (Fa. Behring) auf 100 ml Medium (MEM mit Hanks salt). Die Mischung wird mit Hepes-Puffer (Fa. Roth) auf pH 7,4 eingestellt und bis zum Kochen erhitzt. Anschließend erfolgt das Ausgießen des Agars auf die Petrischale. Nachdem der Agar fest geworden ist, wird die Petrischale bedeckt und über Nacht in den Kühlschrank gestellt.

- 3) Herstellung des Deckagars. Eine Mischung aus 0,7 g Sea Plaque Agarose (Fa. Marine Colloides), 46 ml aqua dest. und 4 ml 1 % DEAE Dextran wird mit 50 ml MEM versetzt und mit Hepes-Puffer auf 7,3 eingestellt.
- 4) Stabilisierte Schafererythrocyten werden 3 x mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und auf 4×10^8 SRBC/0,1 ml eingestellt.
- 5) Die Gewinnung der Milzzellen erfolgt durch Schaben der Milzen in Plastikteesieben. Die Zellen werden in MEM (pH 7,3) aufgenommen und durch gedoppelte Gaze filtriert.
- 6) Zu je 2 ml Deckagar werden mit Eppendorfpipetten 0,1 ml der Milzzellsuspension und 0,1 ml der Schafererythrocyten gegeben und gut vermischt. Diese Mischung wird über den Bodenagar der vorbereiteten Petrischalen ausgegossen und gleichmäßig verteilt.
- 7) Die Petrischalen werden dann für 1 Stunde bei 37°C in den Brutschrank gestellt.
- 8) Anschließend erfolgt die Zugabe von 1:10 verdünntem Meer-schweinchenkomplement (Fa. Travenol) und nochmalige ein-stündige Inkubation bei 37°C .

- 9) Nach der Entnahme aus dem Brutschrank werden die Plaques unter einem Auflichtmikroskop ausgezählt.

In den Tabellen wurde die Anzahl der Plaques pro 10^6 Milzzellen angegeben.

In den auf Seite beschriebenen Experimenten wurde die Immunisierung der NMRI Mäuse folgendermaßen durchgeführt:

Kontrollgruppe:

4×10^8 Schafererythrocyten 1 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung.

Gruppe 47:

4×10^8 Schafererythrocyten in 1 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung. In der Kochsalzlösung wurde vor dem Mischen mit den Schafererythrocyten 200 μ g Poly I:C aufgelöst.

Gruppe 48:

4×10^8 Schafererythrocyten in 1 ml Kochsalzlösung und 200 μ g Poly A:U.

Gruppe 49.

Die Milzen wurden am Tag 2,3,4,5 nach der Immunisierung entnommen und auf die Anzahl plaquebildender Zellen untersucht.

In den auf Seite beschriebenen Experimente wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen.

Alle Versuchstiere (n=25) wurden zum Zeitpunkt null mit 4×10^8 Schafererythrocyten immunisiert. 5 Mäusen wurde gleichzeitig aus einer separaten Spritze 200 μ g Poly I:C intraperitoneal injiziert. Weitere 5 Mäuse erhielten die gleiche Menge des Polynukleotids 4,12,24 und 48 Stunden nach der Immunisierung mit Schafererythrocyten. Nach 96 Stunden wurden alle Tiere getötet und die Milzen entnommen.

Die in diesen Versuchen verwendeten NMRI Mäuse waren männlichen Geschlechts und hatten ein Körpergewicht zwischen 15 und 20 g. Das Alter lag zwischen 8 und 12 Wochen. Die Bestimmung des Interferontiters wurde von Baron vom Laboratory of Viral Diseases (Bethesda Maryland) nach einer Methode von Cantell und Paucker (1963) vorgenommen. Für die freundliche Überlassung der Daten sei an dieser Stelle gedankt.

Transplantation von Tumoren.

Als Tumorzellen wurden in Langzeitkulturen gezüchtete Zellen des amelanotischen Hamstermelanoms A-Mel 3 verwendet. Die Zellen wurden von Herrn Dr.Dr. Hammer (Inst.f.Chir.Forschung) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. In früheren Untersuchungen von Birkmayer (Habilitationsschrift, 1972) konnte der Nachweis erbracht werden, daß es sich beim A-Mel 3 um einen Tumor handelt, der alle Kriterien eines virusinduzierten Tumors erfüllt.

Nach der Entnahme der Tumorzellen aus der Kultur erfolgte die Einstellung der Zellzahl auf 100.000 Zellen pro 0,5 ml Medium. Diese Menge wurde syrischen Goldhamstern mit einem Gewicht von 35 - 40 g (Tierzucht Bäumler, Wolfratshausen) in Äthernarkose subkutan in die Nakenregion injiziert. Zwölf Tage nach der Übertragung der Tumorzellen wurden die Tiere getötet und das Gewicht des Tumors bestimmt.

Der biologische Interferoninduktor H-MP wurde von Herrn Prof. Mayr (Inst.f.Mikrobiologie) zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um ein Hühnerpockenvirus ohne pathogene Wirkung (Mayr 1974, persönliche Mitteilung).

Gruppeneinteilung

Alle Versuchstiere wurden beginnend am Tag der Transplantation täglich durch intraperitoneale Injektionen bis zum zwölften Tag behandelt.

Gruppe 52: 1 ml Kochsalzlösung (n=10).

Gruppe 53: 1 ml H-MP (n=5).

Gruppe 54: 400 ug Poly I:C gelöst in 1 ml Kochsalzlösung (n=5).

Gruppe 55: 400 ug Poly A:U gelöst in 1 ml Kochsalzlösung (n=5).

Bestimmung der Leukocyten und Lymphocyten aus dem peripheren Blut.

Die Entnahme des Blutes erfolgte durch Punktion des Sinus orbitalis mit einem Hämatokritröhrchen. Das Blut wurde in eine mit 3 % Essigsäure gefüllte Leukocytenpipette aufgenommen und für zwei Minuten auf einem automatischen Schüttler gemischt. Anschließend wurde eine Probemenge in eine Neubauerzählkammer eingebracht und die Gesamtzahl der Leukocyten bestimmt. Die Zahl der Leukocyten wurde pro Kubikmillimeter Vollblut angegeben. Von einem Teil des Vollblutes aus dem Hämatokritröhrchen wurde ein Blutaussstrich angefertigt. Die Färbung erfolgte nach May-Grünwald. Von jedem Versuchstier wurden zwei Blutaussstriche angefertigt und ca. 200 Zellen ausgezählt.

Gruppeneinteilung

Gruppe 50: 10 NMRI Mäusen wurde je 0,5 ml Kochsalzlösung in traperitoneal injiziert.

Gruppe 51: 10 NMRI Mäusen wurden je 400 ug Poly I:C, aufgelöst in 0,5 ml Kochsalzlösung, intraperitoneal injiziert.

Statische Berechnungen

Aus den Einzelergebnissen wurde das arithmetische Mittel, sowie die Standardabweichung des arithmetischen Mittels bestimmt. Sind die Ergebnisse zweier Gruppen gegenübergestellt, wurde die Signifikanz der Aussage durch den t-Test nach Student überprüft.

TEIL A.

EINFLUSS VON NATÜRLICHEN NUKLEINSÄUREN AUF DIE IMMUNREAKTION

C. Ergebnisse

1.) Einfluß von natürlichen Nukleinsäuren auf die Überlebenszeit von allogenen Hauttransplantaten bei der Ratte.

Die mittlere Überlebenszeit in der Kontrollserie (Gruppe 1) betrug 11,8 Tage. Wurden die Hauttransplantate in Nukleinsäurehaltiger Kochsalzlösung für 3 Stunden inkubiert (Gruppe 2,4,6,8: Tabelle 1) so war die Überlebenszeit der Hauttransplantate in allen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verlängert. ($p < 0,05$).

Wurden die Versuchstiere zusätzlich mit intraperitonealen Injektionen von Nukleinsäuren am Tag 1,3,5 nach der Transplantation behandelt (Gruppe 3,5,7,9; Tabelle 1), so lag die Überlebenszeit in allen Fällen etwas über den vergleichbaren Gruppen mit alleiniger Inkubation, jedoch waren die Unterschiede niemals statistisch signifikant.

Daraus kann gefolgert werden, daß die zusätzlich intraperitoneale Injektion von Nukleinsäuren bei dem von uns angewandten Schema zu keiner weiteren Verlängerung der Überlebenszeit führt.

Tabelle 1

Überlebenszeiten allogener Hauttransplantate nach Behandlung
mit Nukleinsäuren.

Gruppe	Substanz	n	Ink.	Injekt.	MÜZ	$\pm$ SA	p <	
1	NaCl 0,9%	10	-	-	11,8	0,8		
2	Bierhefe-RNA	10	+	-	15,2	0,4	0,05	N.S.
3	Bierhefe-RNA	10	+	+	15,6	0,6	0,05	
4	Bäckerhefe-RNA	10	+	-	15,7	0,2	0,05	N.S.
5	Bäckerhefe-RNA	10	+	+	16,4	0,8	0,05	
6	Kalbsthymus-DNA	10	+	-	16,2	0,7	0,05	N.S.
7	Kalbsthymus-DNA	10	+	+	16,8	0,7	0,05	
8	Kalbs-RNA	10	+	-	15,6	0,8	0,05	N.S.
9	Kalbs-RNA	10	+	+	16,1	0,5	0,05	

MÜZ = mittlere Überlebenszeit in Tagen

SA = Standardabweichung,

p = Prozent der Irrtumswahrscheinlichkeit

Da, wie im methodischen Teil beschrieben, Nukleinsäuren durch Nukleasen in einzelne Nukleotide gespalten werden, wurde im nächsten Experiment geprüft, ob der immunsuppressive Effekt der Nukleinsäuren auf das Vorhandensein größerer Moleküle (MG 3000) zurückzuführen ist, oder ob auch einzelne Nukleotide in der Lage sind die Überlebenszeit zu verlängern. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, wird nach der Zugabe von Nukleasen keine Verlängerung der Überlebenszeit der Hauttransplantate gegenüber der Kontrollgruppe (Gruppe 1; Tabelle 1) beobachtet. Aus diesem Experiment geht hervor, daß einzelne Nukleotide nicht in der Lage sind, die Überlebenszeit von Hauttransplantaten zu verlängern. Aus diesem Versuchsansatz kann allerdings nicht geschlossen werden, welches Mindestmolekulargewicht nötig ist, um eine immunsuppressive Wirkung zu erzielen.

Tabelle 2

Überlebenszeiten allogener Hauttransplantate nach Behandlung mit Nukleinsäuren und Nukleasen.

Gruppe	Substanz	n	Ink.	Injekt.	MÜZ	<u>±</u> SA	p
10	Bierhefe-RNA +RNase	10	+	-	10,6	0,5	N.S.
11	Bierhefe-RNA +RNase	10	+	+	11,0	1,2	N.S.
12	Bäckerhefe-RNA+RNase	10	+	-	9,7	0,8	N.S.
13	Bäckerhefe-RNA+RNase	10	+	+	9,9	2,1	N.S.
14	KalbsthymusDNA+DNase	10	+	-	10,1	1,7	N.S.
15	KalbsthymusDNA+DNase	10	+	+	11,2	2,1	N.S.
16	Kalbs-RNA + RNase	10	+	-	10,1	1,1	N.S.
17	Kalbs-RNA + RNase	10	+	+	10,5	1,4	N.S.

p bezieht sich auf die Kontrollgruppe 1

Um die Aufspaltung der Nukleinsäuren während der Inkubation, oder nach intraperitonealer Injektion durch Nukleasen des Empfängers zu reduzieren, wurde im nächsten Experiment 0,1 mg Protaminsulfat pro ml Inkubationsmedium bzw. 0,1 mg Protaminsulfat zu 1 ml Injektionslösung hinzugefügt. Wie im methodischen Teil angegeben, hemmt Protaminsulfat die Wirksamkeit von Nukleasen und es war zu prüfen, ob durch diese Behandlung die Überlebenszeit der Hauttransplantate weiter verlängert werden kann.

Die in Tabelle 3 aufgeführten Resultate zeigen, daß durch die Behandlung mit Protaminsulfat (Gruppe: 18, 19, 20, 21) die Überlebenszeit der Hauttransplantate im Vergleich zu den korrespondierenden Gruppen (Gruppe: 3,5,7,9; Tabelle 1) signifikant verlängert werden kann.

Tabelle 3:

Einfluß der Behandlung mit Protaminsulfat auf die Überlebenszeit von allogenen Hauttransplantaten nach Inkubation in Nukleinsäuren und intraperitonealer Injektion von Nukleinsäuren.

Tabelle 3

Überlebenszeiten allogener Hauttransplantate nach Behandlung
mit Nukleinsäuren und Protaminsulfat.

Gruppe	Substanz	n	Ink.	Injekt.	MÜZ	+ SA	$p_1^<$	$p_2^<$
18	Bierhefe- RNA + PS	10	+	+	19,0	0,4	0,001	0,05 (3)
19	Bäckerhefe RNA + PS	10	+	+	20,4	0,5	0,001	0,05 (5)
20	Kalbsthymus DNA + PS	10	+	+	20,4	0,5	0,001	0,05 (7)
21	Kalbs-RNA + PS	10	+	+	21,3	0,9	0,001	0,05 (9)

PS = Protaminsulfat,

p_1 bezieht sich auf die Kontrollgruppe 1

p_2 bezieht sich auf die in den Klammern stehenden Gruppen der
Tabelle 1.

II. Einfluß von natürlichen Nukleinsäuren auf die Überlebenszeit von Xenotransplantaten.

Da die Verwendung von xenogenen Hauttransplantaten für die Behandlung drittgradiger Verbrennungen von großem klinischem Interesse ist (siehe Diskussion), sollte geprüft werden, ob durch die Behandlung mit Ribonukleinsäuren die Überlebenszeit von xenogener Haut verlängert werden kann. Fetale Kalbshaut wurde deshalb gewählt, weil aufgrund früherer Untersuchungen (Rogers et al., 1957) gezeigt werden konnte, daß fetale Kalbshaut im Vergleich zu anderem Hautersatzmaterial sehr günstige Eigenschaften aufweist.

Gruppe 22:

Die mittlere Überlebenszeit der in Kochsalzlösung inkubierten Transplantate betrug 12,5 Tage (mittlerer Fehler des Mittelwertes : 1,0). Die in Nukleinsäurelösung inkubierten Transplantate wiesen eine mittlere Überlebenszeit von 25,2 ($\pm 1,8$) Tagen auf.

Gruppe 23:

Nach Konservierung der Kalbshaut über 24 Stunden, betrug die mittlere Überlebenszeit der in Kochsalzlösung inkubierten Transplantate 10,9 ($\pm 0,9$) Tage. Bei den mit Nukleinsäuren vorbehandelten Transplantate war die Überlebenszeit auf 19,2 ($\pm 1,4$) Tage verlängert (Abb: 2).

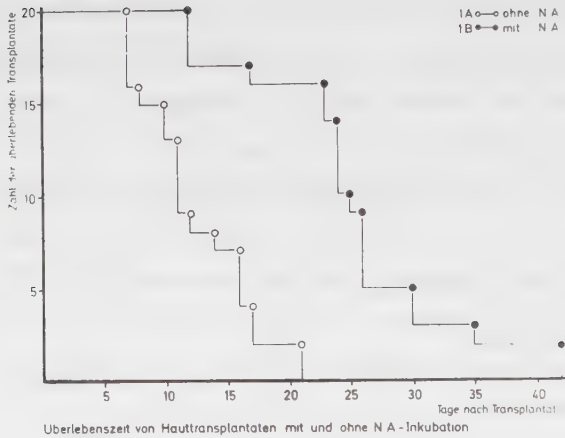


Abb.: 1

Überlebenszeit von fetalen Kalbshauttransplantaten mit und ohne Inkubation in Ribonukleinsäuren.

(schwarze Punkte Inkubation in Ribonukleinsäuren, weiße Punkte Inkubation in Kochsalzlösung).

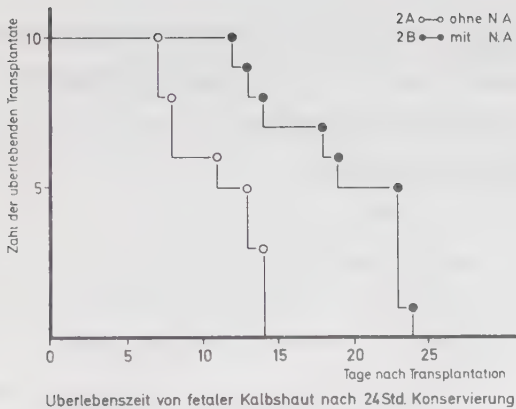


Abb. 2:

Überlebenszeit fetaler Kalbshaut nach 24 Stunden Konservierung.
(schwarze Punkte Inkubation in Ribonukleinsäuren, weiße Punkte
in Kochsalzlösung).

IIa) Histologische Befunde bei der Abstoßungsreaktion von fetaler Kalbshaut.

Da über die histologischen Abstoßungsphänomene bei der Verwendung von fetalen Hauttransplantaten keine Befunde publiziert sind, wurde in den Untersuchungen bei Kaninchen gleichzeitig eine histologische Verlaufskontrolle vorgenommen.

Die ersten Veränderungen zeigen sich ab dem 3. Tag in einem beginnenden Strukturverlust der Epidermis. Die äußerst spärliche, zellige Infiltration ist durch polymorphkernige Leukocyten bedingt. Ferner finden sich große und kleine Lymphocyten. Plasmazellen und Histiocyten treten vereinzelt auf. Im Wundbett beginnen Granulationen und Gefäßsprossungen. Das mäßige zellige Infiltrat besteht vorwiegend aus großen Lymphocyten, Leukocyten, eosinophilen Zellen und Histiocyten. Zwischen dem 8. und 12. Tag zeigt sich ein fortschreitender Strukturverlust des Coriums. Auffallend ist die relativ geringe Anhäufung von Zellen im Wundbett und das Ausbleiben einer wallartigen Abgrenzung zwischen Transplantat und Wundbett. Anzeichen einer Vaskularisation finden sich in den mit RNA behandelten Transplantaten häufiger, sind aber im Vergleich zu Allotransplantaten sehr gering ausgeprägt. Mit besonderer Aufmerksamkeit wurde in allen Präparaten die Grenzzone zwischen Transplantat und Wundbett beobachtet. Die Einsprossung von Kapillaren war auch hier äußerst spärlich. Als

besonders auffällig muß das Fehlen eines leukocytären und lymphocytären wallartigen Infiltrates gelten, das als Abstoßungszeichen gewertet werden könnte. Zu keinem Zeitpunkt fand eine Anhäufung von Zellen im Transplantat oder Wundbett statt, wie dies bei ausgereiften Allo- oder Xenotransplantaten der Fall ist. Lediglich eine mäßige Zunahme der zellulären Infiltration und weniger Plasmazellen im Wirtsgewebe, gefolgt von einer Abnahme des Zellgehaltes ließ den Zeitpunkt vermutlicher immunologischer Abstoßungsreaktionen erkennen. Anschließend kam es zu allmählich fortschreitendem Strukturverlust der Transplantate, während die minimalen entzündlichen Veränderungen im Empfänger-gewebe weiter zurückgingen.

Die mit RNA inkubierten Transplantate zeigen im wesentlichen die gleichen histologischen Phänomene. Im Unterschied zu den unbehandelten Transplantaten ist jedoch der Zeitpunkt der zellulären Infiltration und der Zerstörung des Transplantates um 7 bis 15 Tage verzögert.



Abb. 3:

Xenotransplantat von fetaler Kalbshaut auf Kaninchen. Zwei Tage nach der Transplantation. Epidermis mit Hautanhangsstrukturen gut sichtbar. Corium des Transplantates gemischtzellig infiltriert. Wundbett reaktionslos. Hämatoxylin-Eosin. Mikr. Vergr. 45fach.

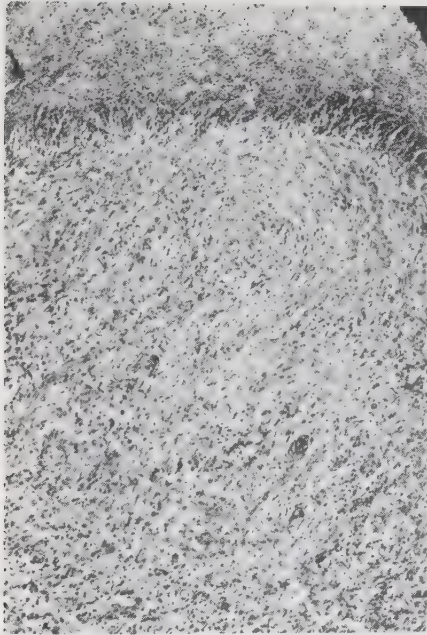


Abb. 4:

Xenotransplantat von fetaler Kalbshaut auf Kaninchen. Sieben Tage nach der Transplantation. Wundbett und Transplantat. Im Wundbett zellreiches Granulationsgewebe mit Kapillarsprossen. Im Transplantat beginnender Strukturverlust des Kollagens und mäßiges zelliges Infiltrat. Fehlen einer wallartigen zelligen Abgrenzung. Hämatoxylin-Eosin. Mikr. Vergr. 64fach.

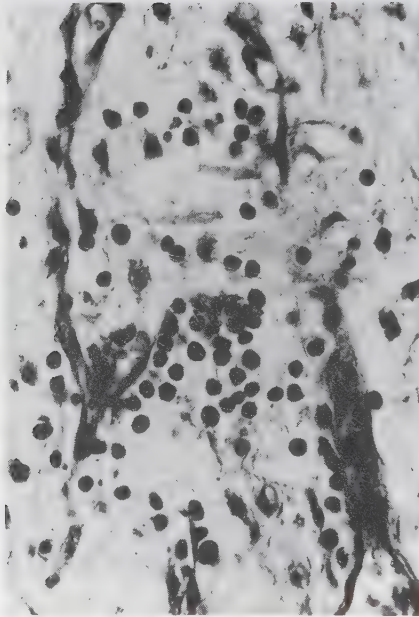


Abb. 5:

Xenotransplantat von fetaler Kalbshaut auf Kaninchen. Elf Tage nach der Transplantation. In der Nachbarschaft von Kapillaren vorwiegend plasmazelliges Infiltrat. Hämatoxylin-Eosin-Mikr. Vergr. 160fach.

Einfluß von RNA auf die Funktionszeit von extrakorporal
perfundierten Rattennieren.

In der Gruppe 24 (Vorperfusion ohne Zusatz von Kalbs-RNA) liegt die mittlere Perfusionsdauer bei 12,6 (+/- 4,8) Minuten. Sofort nach Zugabe des Hundeblutes kommt es zu einem raschen Abfall des Perfusionsvolumens. Die Nieren erschienen vergrößert und dunkelblaurot verfärbt. Die Urinproduktion der Nieren in Gruppe I betrug bis zum Zeitpunkt, der von uns definierten Abstoßung 1,23(+ 0,2) ml. Bereits nach wenigen Minuten konnten in allen Versuchen Erythrocyten im Urin nachgewiesen werden.

In der Gruppe 25 (Vorperfusion mit Kalbs-RNA) ist die mittlere Perfusionszeit bis zum Unterschreiten des Minimalflusses von 0,5 ml/gxmin wesentlich verlängert. (Abb. 6). Sie liegt in dieser Gruppe bei 124,0 (+ 33,4) Minuten. Makroskopisch wurde ein verzögertes Einsetzen der typischen, blauroten Verfärbung des Organs beobachtet. Die durchschnittlich, über die gesamte Versuchsdauer, produzierte Urinmenge betrug 5,88(+ 0,34) ml.

Perfusion von Rattennieren mit Hundeblut

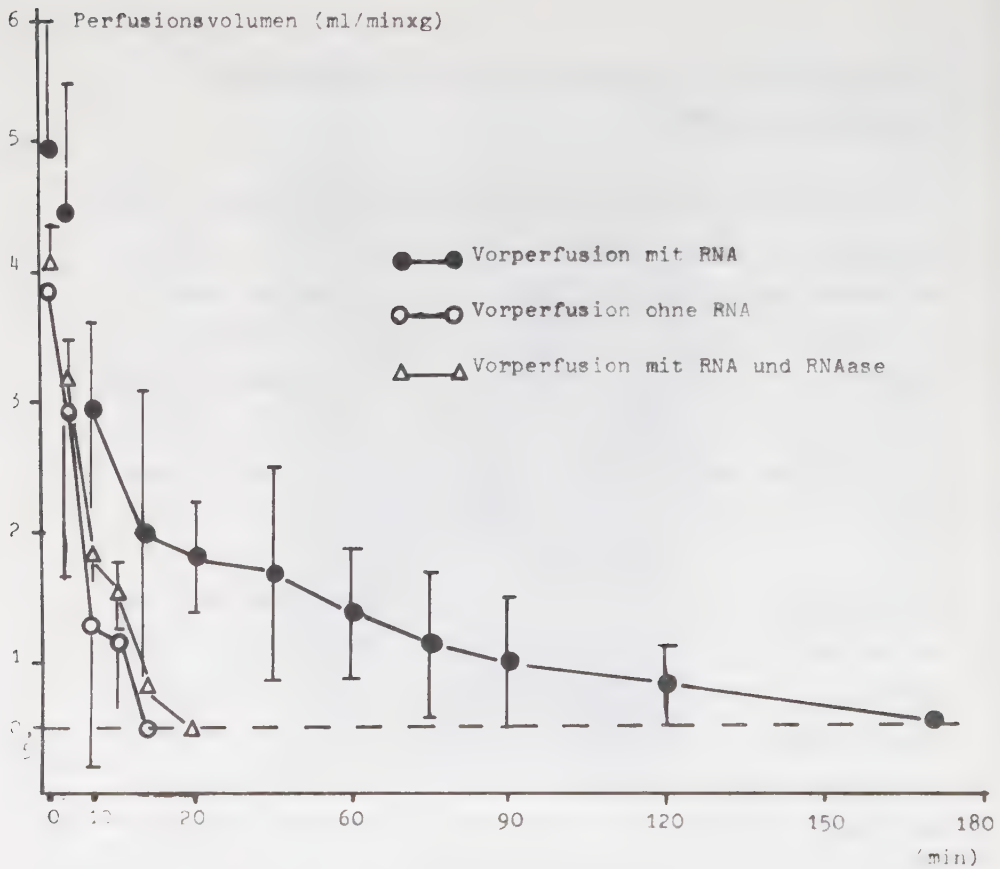


Abb 6: Funktionszeiten von extrakorporal perfundierten Rattennieren

Aus der Abb. 6 geht hervor, daß nach der Vorperfusion mit Ribonuklease behandelter RNA die Funktionszeiten der mit Hundevollblut perfundierten Rattennieren nicht deutlich gegenüber den Kontrollen verlängert sind. Die mittlere Perfusionsdauer bei zehn Rattennieren betrug $14,8 (\pm 6,1)$ Minuten. Die durchschnittlich produzierte Urinmenge betrug $1,14 (\pm 0,2)$ ml.

Untersuchungen über die Aufnahme xenogener Ribonukleinsäuren
in extrakorporal perfundierte Rattennieren.

Die Ergebnisse der extrakorporalen Perfusion von Rattennieren mit Hundeblut, ließen den Schluß zu, daß Ribonukleinsäuren über lokale Einflüsse am Transplantat wirksam werden. Durch Perfusion mit radioaktiv markierten RNA-Molekülen sollte deshalb die Verteilung der RNA in den Rattennieren festgestellt werden.

Die Resultate der autoradiographischen Auswertung von 800 autoradiographischen Präparaten aus 60 Rattennieren, lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

In jedem Fall zeigte sich, daß ein Teil der perfundierten RNA trotz Nachspülung im Gefäßsystem verbleibt. Ein weiterer Teil der in der Niere verbleibenden Substanz verteilt sich im übrigen extrazellulären Raum. In der Gruppe 29 läßt sich der Tracer bereits nach 10 Minuten, sowohl im Kapselraum des Glomerulus und in den Tubuluslichtungen, als auch in den freien Räumen des Interstitiums nachweisen. Dabei steigt die Silberkorndichte mit zunehmender Perfusionsdauer an.

Über dem Kapillarkonvolut des Glomerulus finden sich in Gruppe 29 bereits nach 10 Minuten mehr Silberkörner als in der Kontrollgruppe. Nach Vorbehandlung mit Protamin ist die Silberkorndichte zu diesem Zeitpunkt deutlich höher. Die Dichte der Markierung schwankt von Glomerulus zu Glomerulus. Wegen der vor allem nach längerer Versuchsdauer sehr erheblichen Markierung der Kapillarlichtungen ist eine mögliche intrazelluläre Lokalisation des Tracers nicht eindeutig zu sichern. Eine Anreicherung von Silberkörnern über den Zellkernen ist im Bereich des Glomerulus nicht zu beobachten. Bei weiterer Versuchsdauer nimmt die Markierungsdichte über den Kapillarschlingen wesentlich zu. Nach 30 Minuten ist keine eindeutige Protaminwirkung erkennbar. Durch Perchlorsäure wird das radioaktive Material weitgehend, aber nicht vollständig extrahiert. Gruppe 27 und 28 ist während der gewählten Versuchsdauer keine intrazelluläre Lokalisation des Tracers nachzuweisen. Im Tubulussystem ist in Gruppe 25 nach 30 Minuten eine über den Nulleffekt hinausgehende Markierung des Cytoplasmas zu erkennen. Protamin vermag die Aufnahme radioaktiver Substanz nicht zu erhöhen. Die Markierung der Tubuli ist ungleichmäßig und erscheint im Vergleich zu den Glomeruli gering. Während sich nach 30 Minuten nur vereinzelt Silberkörner über den Zellkernen finden, ist nach 60 Minuten neben einer Markierung des Cytoplasmas an manchen Tubuli eine bevorzugte Markierung der Kerne zu erkennen. Wegen der insgesamt geringen Silberkorndichte ist eine bevorzugte Aufnahme von radioaktiver Substanz in bestimmten Abschnitte des

Tubulussystems nicht nachweisbar. Nach 60 Minuten ist auch bei niedriger RNA-Konzentration eine intrazelluläre Lokalisation des Tracers zu erkennen. Perchlorsäure extrahiert auch an den Tubuli das radioaktive Material weitgehend, aber nicht vollständig. Die Beurteilung der interstitiellen Zellen wird durch die in den Kapillaren verbliebene RNA erheblich erschwert. Allerdings finden sich schon nach kurzer Perfusionsdauer einzelne rundkernige Zellen, sowie Endothelzellkerne, über denen eine Anreicherung von Silberkörnern zu beobachten ist. Im Einzelfall ist jedoch selbst bei PAS-Färbung nicht zu entscheiden, ob die Silberkörner den Zellen, oder einer benachbarten Gefäßlichtung zuzuordnen sind. Während die Zahl markierter rundkerniger Zellen nicht wesentlich zunimmt, sind bei längerer Perfusionsdauer vermehrt Silberkörner über den Endothelzellen zu finden. Zusammenfassend zeigen die Auswertungen aller autographischen Präparate in allen Fällen eine auffallend starke Markierung des Gefäßsystems. Da selbst nach zehnminütiger Nachspülung die meisten Gefäßwände stark markiert sind, darf eine dichte Anlagerung von RNA an das Endothel angenommen werden. Die intrazelluläre Lokalisation markierter RNA ist im Bereich der Tubuli als sicher, an den Glomeruli und im Interstitium als wahrscheinlich zu bezeichnen. Intrazellulär muß das als Tracer verwendete ^3H -Uracil zumindest in dem Umfang in RNA enthalten sein, indem es durch Perchlorsäure extrahiert wird, da Perchlorsäure nur RNA extrahiert. Die markierte cytoplasmatische RNA oder auch deren

Bruchstücken, da in unseren Versuchen die Markierung des Cytoplasmas vor der Markierung der Kerns auftritt, und eine DNA-unabhängige cytoplasmatische RNA-Synthese bestenfalls sehr gering ist.

Beeinflussung der graft-versus-host Reaktion durch natürliche Ribonukleinsäuren.

Die Grundlage der folgenden Experimente ist, daß die graft-versus-host Reaktion eine ausschließlich T-Zell abhängige Reaktion ist. (siehe Diskussion). In der Gruppe 33 wurde untersucht, welchen Einfluß Ribonukleinsäuren auf den zentralen Abschnitt der Immunreaktion haben. Durch die Injektion von Bäckerhefe-RNA 24 Stunden vor der Entnahme der Milzzellen wird der Milzindex gegenüber der Kontrollgruppe nicht verändert.

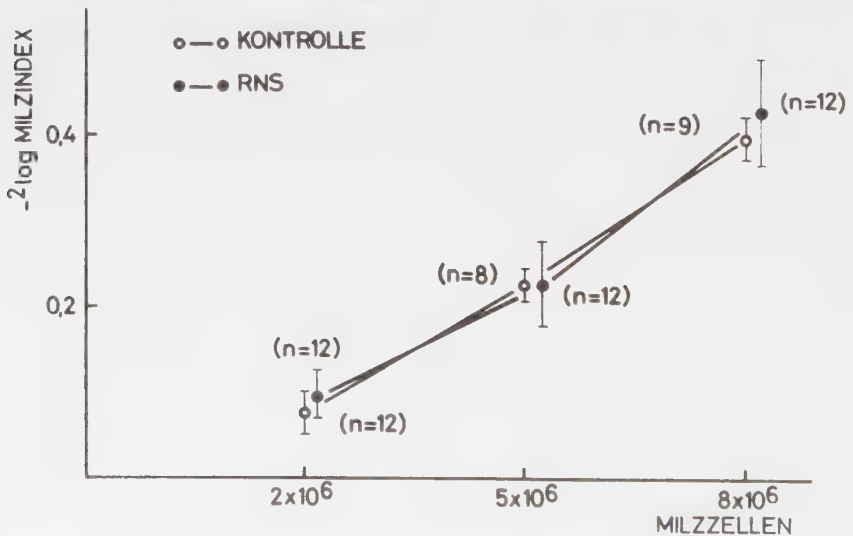


Abb. 1:

Beeinflussung der graft-versus-host Reaktion durch Injektion von Bäckerhefe RNA 42 Stunden vor der Entnahme der Milzzellen (schwarze Punkte: Zellen von Ribonukleinsäure behandelten C3H Mäusen, weiße Punkte: Zellen von C3H Mäusen nach Injektion von Kochsalzlösung).

In Gruppe 34 hingegen ist der Milzindex gegenüber der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,005$) reduziert, wenn die Zellen vorher in RNA-Lösung inkubiert wurden (Abb: 8).

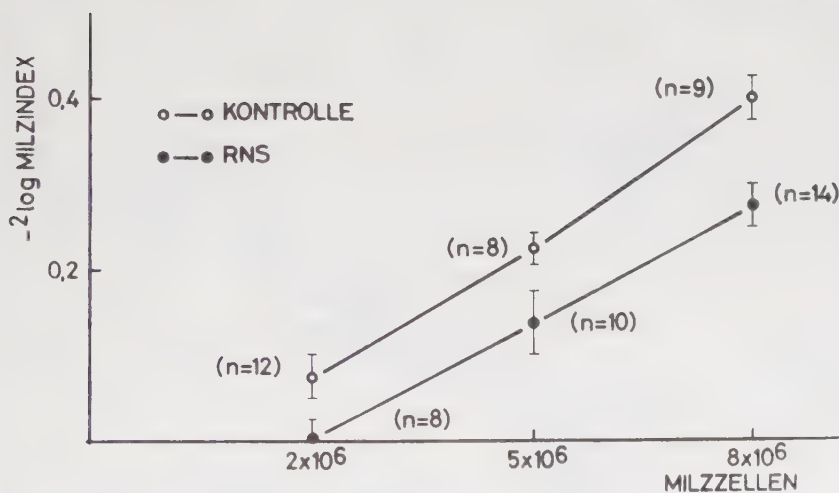


Abb. 8:

Beeinflussung der graft-versus-host Reaktion nach dreistündiger Inkubation von C3H Milzzellen in RNA-Lösung.

(schwarze Punkte in RNA inkubierte Zellen; weisse Punkte in Hankscher Lösung inkubierte C3H Zellen.)

In Gruppe 35 wurden die in Ribonukleinsäure inkubierten Zellen vor der Injektion in die F-1 Hybriden 3 x in Hankscher Lösung gewaschen. Die in Gruppe 2 beobachtete Reduktion des Milzindex gegenüber der Kontrollgruppe durch dieses Vorgehen wieder rückgängig gemacht. (Abb. 9).

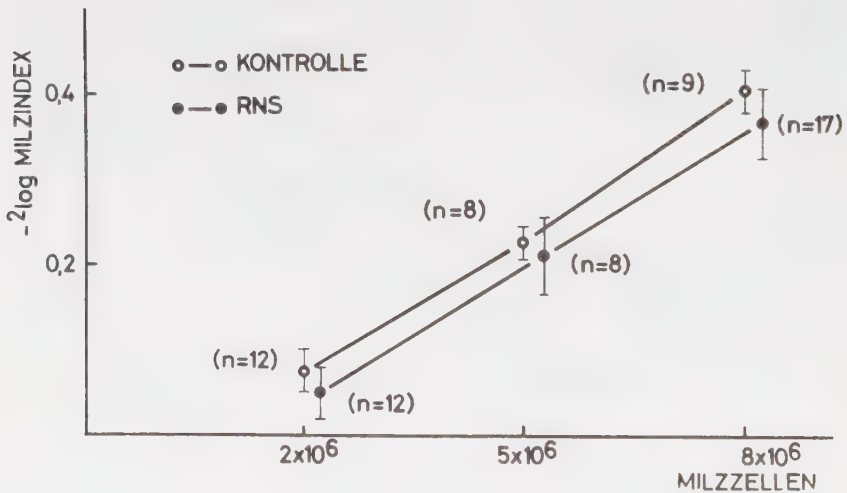


Abb. 9:

Einfluß von Ribonukleinsäuren auf die graft-versus-host Reaktion nach Inkubation von C3H Zellen in RNA-Lösung und anschließendem dreimaligem Waschen. (schwarze Punkte: in RNA inkubierte und gewaschene Zellen; weiße Punkte: in Hankscher Lösung inkubierte Zellen nach dreimaligem Waschen).

TEIL B.EINFLUSS VON SYNTHETISCHEN NUKLEINSÄUREN AUF DIE IMMUNREAKTION

Einfluß von synthetischen Polynukleotiden auf die Überlebenszeit von allogenen Hauttransplantaten.

Im Teil A wurde gezeigt, daß natürliche Nukleinsäuren in der Lage sind, die Überlebenszeit von allogenen Hauttransplantaten bei der Ratte zu verlängern.

In Analogie hierzu wurde geprüft, welchen Effekt die Behandlung mit synthetischen Polynukleotiden zur Folge hat. Es zeigte sich, daß sowohl bei alleiniger Inkubation in Poly A:U bzw. Poly I:C als auch bei kombinierter Behandlung (Inkubation und intraperitoneale Injektion) die Überlebenszeit der Hauttransplantate nicht verlängert wird (Tabelle 4).

Tabelle 4

Überlebenszeiten allogener Hauttransplantate nach Behandlung mit synthetischen Polynukleotiden.

Gruppe	Substanz	n	Inkub.	Injekt.	MÜZ	$\pm$ SA	p
39	Poly I:C	10	+	-	12,2	2,1	N.S.
40	Poly I:C	10	+	+	10,8	1,7	N.S.
41	Poly A:U	10	+	-	9,9	2,3	N.S.
42	Poly A:U	10	+	+	11,4	0,9	N.S.

p bezieht sich auf die Kontrollgruppe 1

Tabelle 4:

Überlebenszeit von allogenen Hauttransplantaten bei Ratten nach Behandlung mit synthetischen Polynukleotiden.

Da die Wirkung immunologischer Adjuvantien häufig vom Zeitpunkt der Applikation abhängt (Brent et al., 1974) wurden in Gruppe 5 und 6 die synthetischen Polynukleotide 12 Stunden vor der Transplantation injiziert. Eine Inkubation in polynukleotidhaltiger Lösung wurde nicht vorgenommen. Dabei zeigte sich, daß eine Verlängerung der Überlebenszeit nur bei der Vorbehandlung mit Poly I:C nicht aber mit Poly A:U erreicht wird. (Tabelle 5).

Tabelle 5

Einfluß der Vorbehandlung mit synthetischen Polynukleotiden auf die Überlebenszeit von allogenen Hauttransplantaten bei der Ratte.

Gruppe	Substanz	n	Injekt. 12 Std. vor Transplantation	MÜZ	± SA	p
43	Poly I:C	10	+	16,5	1,1	p ₁ 0,05 p ₂ 0,05
44	Poly A:U	10	+	11,9	1,3	p ₁ 0,05

p₁ bezieht sich auf die Kontrollgruppe 1

p₂ bezieht sich auf Gruppe 43 und 44.

Seifert et al. berichteten 1973 über Experimente in welchem die Kombination von Freundschem Adjuvans mit Antilymphocytenserum zu einer deutlichen Verlängerung der Überlebenszeit allogener Hauttransplantate bei Ratten führt. Es war deshalb im Rahmen dieser Arbeit von Interesse, die Wirkung der gemeinsamen Applikation von Antilymphocytenserum und synthetischen Polynukleotiden zu untersuchen. Allen Versuchstieren wurden an den Tagen 1,3,5 nach der Hauttransplantation ALS und Polynukleotide intraperitoneal injiziert.

Wie in Tabelle 6 aufgezeigt, wird sowohl bei Hinzugabe von Poly I:C als auch von Poly A:U der immunsuppressive Effekt von Antithymocytenserum aufgehoben. Die Überlebenszeit der Hauttransplantate behandelter Tiere unterscheidet sich nicht signifikant von den unbehandelten Tieren. (Gruppe 1, Tabelle 1).

Tabelle 6

Überlebenszeiten allogener Hauttransplantate nach Behandlung mit synthetischen Polynukleotiden und ATS.

Gruppe	Substanz	n	Injektion	MÜZ	$\pm$ SA	p
45	ATS	10	+	22,9	1,5	
46	Poly I:C	10	+	12,4	0,9	0,001
47	Poly A:U	10	+	13,2	0,6	0,001

Einfluß von synthetischen Polynukleotiden auf die graft-versus-host Reaktion.

Die Aufhebung des immunsuppressiven Effekts von RATS durch synthetische Polynukleotide könnte unseren Versuchen durch eine Steigerung der thymusabhängigen Immunität erklärt werden. Diese Versuche gaben aber keine Auskunft darüber, in welchem Abschnitt der Immunreaktion synthetische Polynukleotide angreifen. Die graft-versus-host Reaktion stellt ein in vivo Korrelat der MLC dar, und ist somit vom Vorgang der Antigenerkennung abhängig. In den folgenden Versuchen wurde deshalb der Einfluß von synthetischen Polynukleotiden auf die graft-versus-host Reaktion untersucht.

Die Spendertiere (weibliche C3H Mäuse) wurden 24 Stunden vor der Entnahme der Milzzellen mit 1000 ug Poly I:C bzw. A:U intraperitoneal behandelt. Nach dreimaliger Waschung der Milzzellen wurden diese in 4 Tage alte F-1 Hybriden intraperitoneal injiziert. Abb. 10 und Abb. 11 zeigen, daß durch synthetische Polynukleotide Vorbehandlung eine Steigerung des Milzgewichtes gegenüber unbehandelten Kontrollen auftrat.

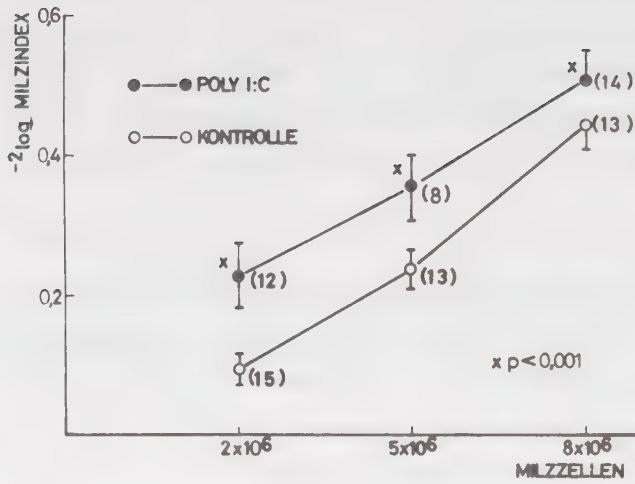


Abb. 10:

Einfluß von Poly I:C auf die graft-versus-host Reaktion bei
 C3H x DBA/J2 F-1 Hybriden.

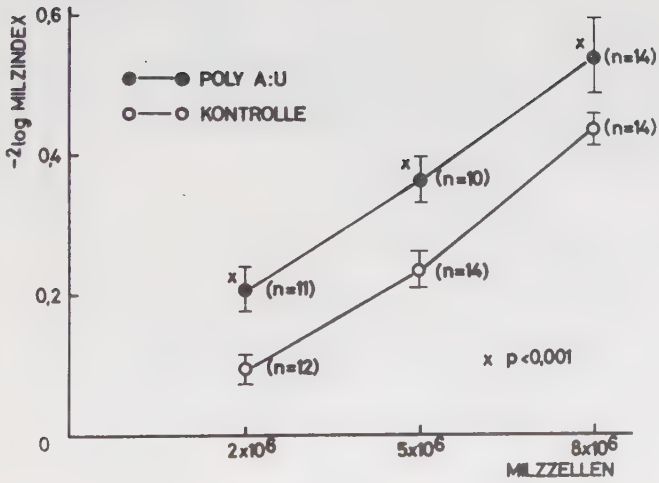


Abb. 11:

Einfluß von Poly A:U auf die graft-versus-host Reaktion bei C3H x DBA/J2 F-1 Hybriden.

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß geringe Mengen von synthetischen Polynukleotiden an den Übertragenen Milzzellen zu einer unspezifischen Splenomegalie führen, wurden F-1 Hybriden mit Poly I:C bzw. Poly A:U allein behandelt.

Nach 9 Tagen wurden die Milzen dieser Tiere entfernt und das relative Milzgewicht mit dem unbehandelten, gleichaltriger F-1 Hybriden verglichen.

Aus Abb. 12 geht hervor, daß sich die relativen Milzgewichte mit verschiedenen Dosen von synthetischen Polynukleotiden behandelten Tieren nicht von unbehandelten F-1 Hybriden unterscheiden. Eine durch synthetische Polynukleotide hervorgerufene unspezifische Splenomegalie konnte somit ausgeschlossen werden.

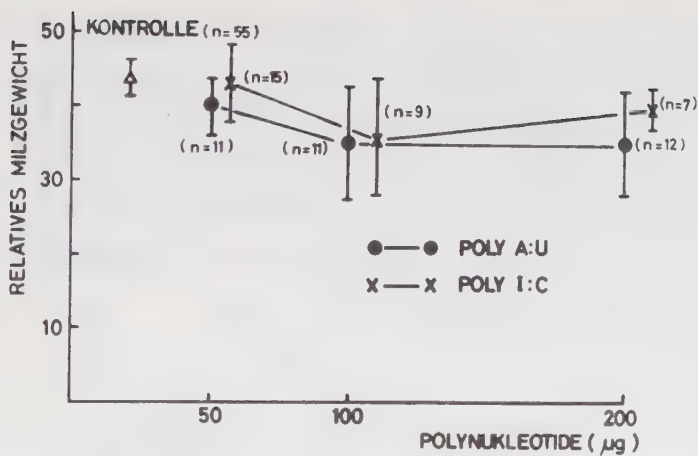


Abb. 12:

Einfluß der direkten Applikation von synthetischen Polynukleotiden in C3H x DBA/J2 F-1 Hybriden.

Einfluß von synthetischen Polynukleotiden auf die Antikörperbildung gegen T Zell abhängige Antigene.

Die Verstärkung der graft-versus-host Reaktion erbrachte den ersten sicheren Hinweis auf eine spezifische Aktivierung von T Zellen durch synthetisches Polynukleotid. Um diese Resultate in einem anderen Testsystem zu überprüfen, wurde in den folgenden Experimenten der Einfluß von synthetischen Polynukleotiden auf die Bildung von antikörperbildenden Zellen gegen ein T Zell abhängiges Antigen untersucht.

In den Abbildungen 13 und 14 ist dargestellt, daß es bei der Immunisierung von NMRI Mäusen Schafer erythrocyten und synthetischen Polynukleotiden zu einer hoch signifikanten Steigerung der Anzahl plaquebildender Zellen gegenüber den Kontrollen kommt. Neben dieser Steigerung der Anzahl von plaquebildenden Zellen führen synthetische Polynukleotide auch zu einem früheren Anstieg von plaquebildenden Zellen.

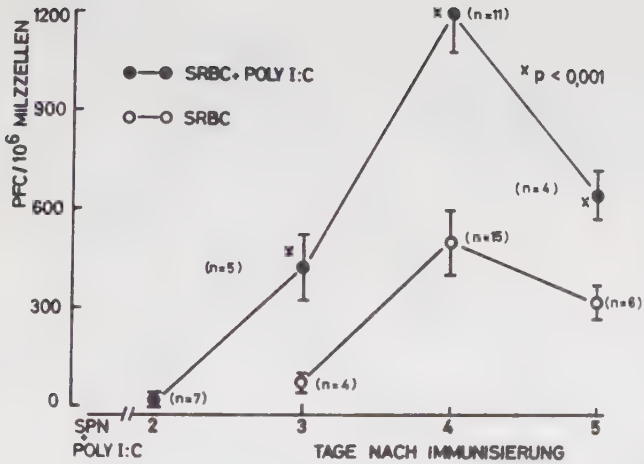


Abb. 13:

Einfluß von Poly I:C auf die Anzahl plaquebildender Zellen gegen Schafererythrocyten (am Tag zwei konnten bei alleiniger Immunisierung mit Schafererythrocyten keine Plaques gefunden werden). SRBC-Schafererythrocyten, SPN= synthetisches Polynukleotid.

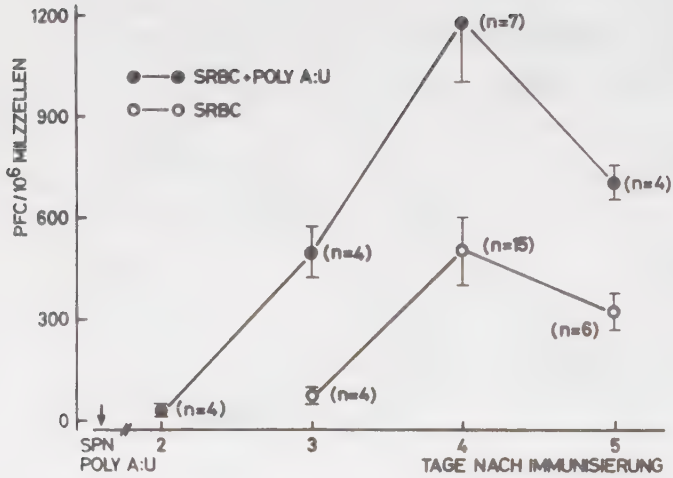


Abb. 14:

Einfluß von Poly A:U auf die Anzahl plaquebildender Zellen gegen Schafererythrocyten (am Tag zwei konnten bei alleiniger Immunisierung mit Schafererythrocyten keine Plaques gefunden werden). SRBC=Schafererythrocyten, SPN=synthetisches Polynukleotid. ($p < 0,001$)

Untersuchung der Abhängigkeit der Antikörperbildung gegen
T Zell abhängige Antigene vom Interferonspiegel.

Einer der wesentlichen Gründe, weshalb die Adjuvanswirkung von synthetischen Polynukleotiden bisher nicht in größerem Ausmaß zur Therapie von malignen Tumoren beim Patienten ausgenutzt wurde, ist darin zu sehen, daß nach mehreren Berichten von Gadzar und Mitarbeitern (1972a, 1972b, 1973) ein verstärktes Wachstum von Tumoren nach Behandlung mit Poly I:C zu beobachten war. In früheren Untersuchungen haben Johnson et al. (1968) bereits darauf hingewiesen, daß die Bildung von Antikörpern gegen Rindergammaglobulin (BGG) reduziert war, wenn Poly I:C 6 - 18 Stunden vor dem Antigen injiziert wurde. In neueren Untersuchungen konnten Kong und Capanna (1974) nachweisen, daß die Induktion von Toleranz gegen Rinderserumalbumin erleichtert war, wenn synthetisches Polynukleotid 12 - 24 Stunden vor dem Tolerogen den Versuchstieren appliziert wurde. In eigenen Untersuchungen (Seite) wurde aufgezeigt, daß die Überlebenszeit von allogenen Hauttransplantaten bei Ratten verlängert war, wenn die Tiere mit einer einzigen Dosis von Poly I:C 18 Stunden vor der Transplantation behandelt wurden. Nach der Durchsicht der von Gadzar et al. veröffentlichten Resultate fiel auf, daß das Wachstum von Tumoren nur dann verstärkt war, wenn die Versuchstiere mit einer einzigen Dosis Poly I:C, in einem Zeitraum von 12- 24 Stunden vor der Übertragung der Tumorzellen vorbehandelt wurden. Bemerkenswert ist, daß keine Resultate über einen derartigen Effekt bei der Verwendung von Poly A:U vorliegen.

Da Poly A:U im Gegensatz zu Poly I:C ein schwacher Interferon-induktor ist (Baron et al., 1972; Hillemann et al. 1972) konnte vermutet werden, daß es während der Phase der Interferonbildung zu einer Abschwächung der immunologischen Reaktivität kommt. In den folgenden Untersuchungen wurde deshalb geprüft, ob und in welchem Mass die Induktion von antikörperbildenden Zellen gegen Schafererythrocyten durch den zum Zeitpunkt der Immunisierung bestehenden Interferontiter beeinflusst wird.

Im oberen Abschnitt der Abb. 15 ist der Interferonspiegel nach 4, 12, 24 und 48 Stunden nach der Injektion von Poly I:C aufgetragen. Der Interferonspiegel zum Zeitpunkt der Injektion betrug 0. Das Maximum des Interferontiters wurde nach 4 Stunden gemessen. Im Verlauf der weiteren 44 Stunden kommt es dann zu einem Abfall auf niedrigere Werte, die aber noch nach 48 Stunden über dem Ausgangswert liegen.

Werden Schafererythrocyten (Abb. 15 unterer Abschnitt) gleichzeitig mit Poly I:C injiziert, so erreicht die Bildung von antikörperbildenden Zellen ein Maximum. Wird das Polynukleotid zu einem Zeitpunkt injiziert in welchem die durch Poly I:C hervorgerufene Interferonbildung bereits in Gang gekommen ist, so kommt es zu einer Reduktion der antikörperbildenden Zellen. Vergleicht man den Verlauf beider Kurven, so wird ersichtlich, daß es beim Abfallen des Interferontiters wiederum zu einem Anstieg der antikörperbildenden Zellen kommt.

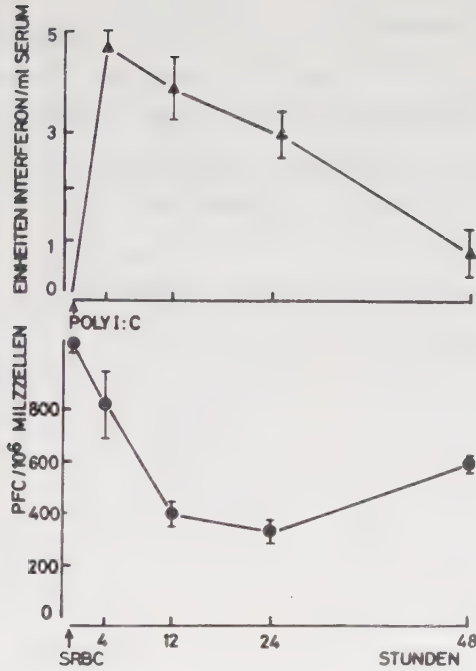


Abb. 15:

Interferonspiegel nach einmaliger Injektion von 200 μ g Poly I:C (obere Kurve); Anzahl der antikörperbildenden Zellen (unter Kurve). Der Interferonspiegel wurde in Einheiten/ml Serum angegeben.

Um auszuschließen, daß der in Abb. 15 dargestellte Abfall von antikörperbildenden Zellen durch eine lymphocytotoxische Wirkung von Poly I:C hervorgerufen wird, wurde die Anzahl der peripheren Leukocyten und Lymphocyten nach intraperitonealer Injektion von Poly I:C bestimmt. In der Tabelle sind Zahlen peripherer Leukocyten und Lymphocyten bis zum 10.Tag nach der einmaligen Injektion von 400 ug Poly I/C aufgetragen. Es zeigte sich, daß keine signifikante Änderung eintritt.

Kontrolle

SPN-Behandlung

Tag	n	Leukocyten ⁺	Lymphocyten ⁺	Leukocyten ⁺	Lymphocyten ⁺
1	10	7,4 $\pm$ 0,4	6,5 $\pm$ 0,3	7,5 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 0,3
2	10	7,6 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 0,2	7,2 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,2
3	10	7,5 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,3	7,3 $\pm$ 0,2	5,9 $\pm$ 0,3
4	10	7,5 $\pm$ 0,3	6,5 $\pm$ 0,1	7,5 $\pm$ 0,1	6,0 $\pm$ 0,3
5	10	7,5 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,2	7,5 $\pm$ 0,2	6,5 $\pm$ 0,3
6	10	7,5 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 0,1	7,6 $\pm$ 0,2	6,5 $\pm$ 0,2
7	10	7,4 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 0,2	7,5 $\pm$ 0,1	6,5 $\pm$ 0,2
8	10	7,4 $\pm$ 0,2	6,5 $\pm$ 0,1	7,6 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,3
9	10	7,6 $\pm$ 0,3	6,7 $\pm$ 0,2	7,5 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,3
10	10	7,5 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 0,5	7,6 $\pm$ 0,2	6,5 $\pm$ 0,2

⁺($\times 10^3$ Zellen/mm³)

Tumorstadium unter der Behandlung mit synthetischen Polynukleotiden.

In den durchgeführten Versuchen wurde erstmals vergleichend der Einfluß von Poly I:C, Poly A:U und einem biologischem Interferoninduktor untersucht. In der Gruppe 52 hatten die Tumoren nach 12 Tagen ein durchschnittliches Gewicht von 4,23 g. Drei von insgesamt 10 Tieren waren bereits vor der Entnahme gestorben. Bei der Behandlung mit dem biologischen Interferoninduktor (Gruppe 53) H-MP und Poly I:C (Gruppe 54) war das Wachstum hoch signifikant reduziert. Poly A:U behandelte Tiere wiesen ein mittleres Tumorgewicht von 2,7 g auf (Gruppe 55). In den Gruppen (53 - 55) überlebten alle Versuchstiere bis zum zwölften Tag.

Tabelle 8

Tumorgewichte nach der Behandlung mit synthetischen Polynukleotiden und einem biologischen Interferoninduktor.

Gruppe	n	Behandlung	mittleres Tumorgew. (g)	p	Mortalität(%)
52	10	Kochsalzlösung	4,23		23
53	5	H-MP	1,63	0,001	0
54	5	Poly I:C	1,77	0,001	0
55	5	Poly A:U	2,70	0,05	0

E. Diskussion zum Teil A

Verlängerung der Überlebenszeit allogener Hauttransplantate durch Nukleinsäurebehandlung.

Die erste Publikation über die Anwendung von Nukleinsäuren in der Transplantationsimmunologie stammen von Ashley und Axelrod (1959). Den Autoren gelang es durch intrakardiale Injektion von DNA und RNA in neugeborene Ratten Toleranz zu erzeugen. Als Nukleinsäurespender wurden Ratten des Stammes verwendet, von welchen später auch Haut zur Transplantation übertragen wurde. Wurde die Hauttransplantation vor dem 20. Tag nach der Injektion vorgenommen, so konnte die Überlebenszeit der Hauttransplantate signifikant verlängert werden. In weiteren Versuchen konnte nachgewiesen werden, daß radioaktiv markierte DNA- und RNA-Moleküle durch die Placenta in den Fetus eindringen. Der stichhaltige Nachweis einer spezifischen Immuntoleranz konnte von den Autoren allerdings nicht erbracht werden. Axelrod und Lowe berichteten 1961, daß die Überlebenszeit von Rattenhaut in allogenen Systemen durch Vorbehandlung mit empfängerspezifischer RNA verlängert werden konnte. Da auch andere Autoren bei der Verwendung von Spender- oder Empfänger-RNA über eine Verlängerung von Nieren- und Hauttransplantaten berichteten (Jolley et al., 1966; Lemperle et al. 1969; Groth et al., 1968) wurde angenommen, daß die Wirksamkeit der Nukleinsäuren von ihrer Spezifität (aus Empfänger oder Spender) abhängig ist (Jolley et al., 1968).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden in Gruppe 2 - 9 verschiedene Nukleinsäuren zur Inkubation der Hauttransplantate und zur Injektion verwendet. Es zeigte sich, daß in den Gruppen 2,4,6,8 die Überlebenszeiten der Hauttransplantate durch alleinige Inkubation in nukleinsäurehaltiger Kochsalzlösung verlängert werden. In den Gruppen 3,5,7,9 wurde an den Tagen 1,3,5 nach der Transplantation zusätzlich Nukleinsäurelösung injiziert. Diese Behandlung erbrachte jedoch keine weitere Verlängerung gegenüber den Gruppen mit alleiniger Inkubation (2,4,6,8) und gegenüber der Kontrollgruppe (1). Vergleicht man die immunsuppressive Wirkung der verschiedenen Nukleinsäuren untereinander, so sind die Unterschiede statistisch nicht signifikant.

Diese Befunde zeigen, daß Spender- oder Empfängerspezifität der Nukleinsäuren nicht zur immunsuppressiven Wirkung nötig sind. Im Verlauf dieser Arbeit konnten diese Befunde insoweit bestätigt werden, als es Uhlschmidt et al. (1971) und Lemperle et al. (1972) gelang die Überlebenszeit von Hauttransplantaten bzw. Herztransplantaten durch Verwendung von Hefe-RNA zu verlängern.

Die in Tabelle 1 aufgeführten Resultate zeigen weiterhin, daß es durch kombinierte Anwendung von Inkubation und Injektion an den Tagen 1,3,5 nach der Transplantation (Gruppe 3,5,7,9) zu keiner Verlängerung der Überlebenszeit gegenüber den korrespondierenden Gruppen (2,4,6,8) kommt.

Diese Resultate sind ein Hinweis dafür, daß die Wirkung der Nukleinsäuren durch lokale Einflüsse am Transplantat bedingt sind. Die bislang einzigen Befunde die gegen diese Annahme sprechen, wurden von Seinfeld und Brendel publiziert (1972). Den Autoren gelang es die Überlebenszeit von allogenen Hundenernieren durch Perfusion mit RNA und intramuskulärer Injektion von 100 mg RNA in fünftägigen Abständen auf die mittlere Überlebenszeit von 18,4 auf 23,4 Tagen zu steigern. Da die verwendeten Hunde jedoch nicht nach serologisch- und lymphocyten-definierten Antigenen getestet wurden und nur vier Transplantationen durchgeführt wurden, können diese Resultate nicht als stichhaltiges Gegenargument für die oben aufgeführten Befunde dienen. Allerdings sprechen neuere Befunde (Scharowskie et al. 1973) dafür, daß bei Ratten durch alleinige intraperitoneale Injektion die Überlebenszeit von Ovarialtransplantaten verlängert und das Wachstum von Tumoren verstärkt wird. In allen Experimenten wurden aber wesentlich höhere Dosen an RNA verabreicht, als in den, in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten. Die Wirkung des lokalen Einflusses der Nukleinsäuren konnte in klinischen Untersuchungen (H. Bohmert, 1972) beobachtet werden. Patienten mit großflächigen, drittgradigen Verbrennungen wurde fetale Kalbshaut als Interimstransplantat übertragen. Dabei zeigte sich, daß beim gleichen Patienten die in RNA inkubierte Kalbshaut eine, um mehrere Tage verlängerte Überlebenszeit aufwies. Bei einem Patienten dem fetale Kalbshaut ohne Nukleinsäureinkubation übertragen wurde, musste das völlig eingetrocknete Transplantat bereits nach 3 Tagen entfernt werden.

Einfluß der Nukleasebehandlung.

Nach der im methodischen Teil beschriebenen Behandlung von RNA mit Rinderpankreasribonuklease werden die Ribonukleinsäuren in Nukleotide aufgespalten. Die Sedimentationskonstante liegt nach dieser Behandlung bei 2 S, was eine komplette Aufspaltung der Ribonukleinsäuren beweist. In den durchgeführten Untersuchungen war es von Interesse zu prüfen, ob für den immunsuppressiven Effekt der Nukleinsäuren größere Moleküle (S 5-28) nötig sind, oder ob auch Nukleotide wirksam sind. Die zur Inkubation und Injektion verwendeten Nukleinsäuren wurden deshalb vor der Verwendung mit Nukleasen versetzt. Durch diese Behandlung wird der immunsuppressive Effekt der Nukleinsäuren völlig aufgehoben (Tabelle 2, Gruppe: 14-21). Diese Befunde sprechen dafür, daß zur immunsuppressiven Wirkung der Nukleinsäuren größere Moleküle als Nukleotide benötigt werden. Inwieweit hierbei auch die Struktur der Nukleinsäuren eine Rolle spielt und welches Mindestmolekulargewicht nötig ist, kann nicht beantwortet werden. In Untersuchungen von Groth et al. (1968) und Colmerauer et al. (1973) konnte diese Beobachtung in anderen Systemen bestätigt werden.

Einfluß der Behandlung mit Protaminsulfat.

Aus den in Tabelle 2 dargestellten Resultaten geht hervor, daß zum immunsuppressiven Effekt der Nukleinsäuren zumindest größere Moleküle als Nukleotide nötig sind. Da angenommen werden muß, daß während der Inkubation ein Teil der Nukleinsäuren durch aus der Spenderhaut freigesetzte Nukleasen zerstört wird und das gleiche nach der intraperitonealen Injektion durch Nukleasen des Empfängers bewirkt wird, wurden die zur Inkubation und zur Injektion verwendeten Nukleinsäuren mit Protaminsulfat versetzt. Protaminsulfat hat die Eigenschaft mit Nukleinsäuren feste Verbindungen einzugehen, die sehr resistent gegen spezifische Hydrolasen und physikalische Degradierungen sind. So werden zum Beispiel die Nukleinsäuren von Viren durch den Protamingehalt ihrer Kapsel vor dem Angriff von Nukleasen geschützt (Borenfreund et al., 1961).

Durch diese Behandlung mit Protaminsulfat war es (Tabelle 3, Gruppe: 22, 23, 24, 25) möglich, die Überlebenszeit der allogenen Hauttransplantate gegenüber den korrespondierenden Gruppen (Tabelle 1, Gruppe: 3, 5, 7, 9) statistisch signifikant zu verlängern. Diese Befunde sind ein weiterer Hinweis dafür, daß zum immunsuppressiven Effekt der Nukleinsäuren größere Moleküle nötig sind.

Groth et al. (1968) konnten nachweisen, daß bei der Behandlung von RNA mit Diethylaminoethyl-dextran (DEAE-Dextran) die Überlebenszeit allogener Hundenieren verlängert wird. DEAE-Dextran besitzt ähnliche Eigenschaften wie Protaminsulfat (Pagano et al. 1965).

Besprechung der Wirkung natürlicher Ribonukleinsäuren in
xenogenen Systemen.

Xenogene Abstoßungsreaktionen können prinzipiell in zwei verschiedene Typen eingeteilt werden:

1. Reaktionen mit nachweisbarer zellulärer Beteiligung. Hierbei ist es möglich, die Funktion des Transplantates durch ALG, Cortison und Bestrahlung zu verlängern und
2. die vorwiegend durch humorale Antikörper bedingte dem hyperakuten Typ entsprechende Abstoßungsreaktion, die mit herkömmlichen Immunsuppressiva nicht zu beeinflussen ist.

Das von uns verwendete System Hund-Ratte entspricht dem hyperakuten Typ und kann nach Calne (1971) als "discordant" bezeichnet werden. Die durchschnittliche Zeit bis zur von uns definierten Abstoßung betrug nur wenige Minuten. Die initiale Reaktion im Ablauf der hyperakuten Abstoßung ist durch die Anlagerung des präformierten Antikörpers an das Gefäßendothel gegeben. Durch diesen Antigen-Antikörperkomplex kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems, was eine Aggregation von Thrombozyten, eine Anlagerung von Leukocyten, das Freiwerden von vasoaktiven Substanzen und eine verstärkte Permeabilität der Kapillaren zur Folge hat. Der Antigen-Antikörperkomplex führt weiterhin zur Auslösung gerinnungsfördernder Prozesse, und zur Aktivierung des Kininsystems.

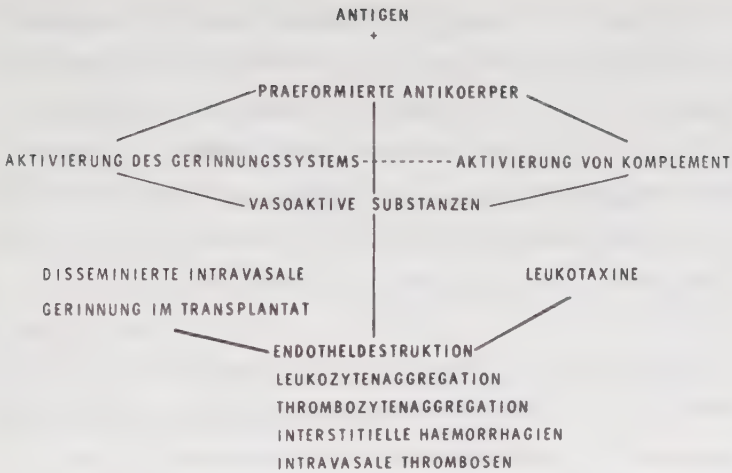


Abb. 6:

Schematische Darstellung der Vorgänge die zur hyperakuten Abstoßung von Xenotransplantaten führen. (Modifiziert nach Shons et al. 1972).

Durch angelagerte zelluläre Elemente werden proteolytische Fermente freigesetzt, welche die Gefäßstruktur zerstören. Aggregate aus Thrombocyten und Leukocyten, sowie Fibrinablagerung führen zum Sistieren des Blutflusses, und damit zur Ischämie des Transplantates. In der Abb. 16 sind diese Vorgänge schematisch dargestellt.

Land und Mitarbeiter (v. Liebe, Schilling, Aldenhoff, Correll, Pratschke) konnten in einer Reihe von Untersuchungen nachweisen, daß sich die oben beschriebenen Vorgänge der hyperakuten Abstoßung an dem Modell der extrakorporalen Perfusion an einer Herz-Lungen Maschine weitgehend simulieren lassen. In allogenen Systemen können dagegen nur, die nicht immunologisch bedingten Faktoren untersucht werden (Schilling, 1972).

Da es in diesem Versuch von Interesse war, den Einfluß von Nukleinsäuren auf einen ausschließlich durch humorale Antikörper verursachten Abstoßungsvorgang zu untersuchen, wurde dieses Modell benützt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß durch Vorperfusion der Rattennieren mit Ribonukleinsäuren die Dauer der Transplantatfunktion von 12,6 auf 124,0 Minuten verlängert werden konnte. Da in den autoradiographischen Untersuchungen eine starke Anlagerung der RNA-Moleküle an die Gefäßwand nachgewiesen werden konnte, vermuten wir, daß die präformierten Antikörper am Kontakt mit dem Gefäßendothel gehindert werden. Diese Ansicht wird dadurch bestärkt, daß es nach Behandlung der RNA mit Ribonuklease nicht möglich war, die Überlebenszeit zu verlängern. Hieraus kann geschlossen werden, daß eine Mindestgröße der Moleküle zur Maskierung der Antigene nötig ist. Eine Hemmung des Komplementsystems durch RNA kann zwar nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber durch das Fehlen jeglicher Hinweise in der Literatur als unwahrscheinlich.

Seinfeld und Brendel (1969) berichteten über Befunde, wonach die Abstoßung von Schweinenieren bei der extrakorporalen Perfusion mit Hundeblut signifikant verzögert werden konnte, wenn die Spendernieren vor dem Anschluß an den Kreislauf der Hunde mit 100 mg Kalbs-RNA / 1000 ml Ringerlösung 30 Minuten lang perfundiert wurden. Die Autoren vermuten, daß sich die RNA Moleküle mit präformierten natürlichen Antikörpern komplexieren und somit die hyperakute Abstoßung verzögern. Ein Beweis für diese Hypothese konnte bislang allerdings nicht erbracht werden.

Für die eigene Annahme einer Maskierung von Antigenen sprechen neben den autoradiographischen Befunden auch die Resultate von Ellis et al. (1969). Es konnte gezeigt werden, daß Kollagen, eine Substanz mit ähnlicher Sekundärstruktur wie Ribonukleinsäuren, nach Vorperfusion des Spenderorgans eine Verlängerung der Überlebenszeit bewirkt. Die Lokalisation der Kollagenmoleküle am Gefäßendothel der Nieren wurde fluoreszenztechnisch nachgewiesen. Wurden die Moleküle vor der Transplantation durch Perfusion mit Kollagenase entfernt so lag die Funktionszeit der Nieren nicht über denen der Kontrollgruppe.

Aufnahme radioaktiv markierter Ribonukleinsäuren in extra-
korporal perfundierte Rattennieren.

Bei der Perfusion von Rattennieren mit radioaktiv markierten Ribonukleinsäuren aus E.Coli können folgende charakteristischen Befunde herausgestellt werden:

- a. Es findet sich in allen Gruppen trotz Nachspülung eine sehr starke Anlagerung der Moleküle an die Gefäßwände.
- b. Frühzeitige Ablagerung von Ribonukleinsäuren konnte in den Kapselräumen der Glomeruli, in den Tubuluslichtungen und in den freien Räumen des Interstitiums nachgewiesen werden.
- c. Nach längerer Perfusionsdauer kommt es zu einer deutlichen Markierung von Endothelzellen.
- d. Eine Markierung des Cytoplasmas und der Zellkerne kann in bestimmten Bereichen der Niere (Endothel, Tubuli) als sicher angenommen werden.

Durch Behandlung der histologischen Präparate mit Perchlorsäure konnte ferner gezeigt werden, daß es sich bei den markierten Molekülen um Ribonukleinsäuren handelt. Hierzu wurden die Präparate vor und nach der Behandlung mit Perchlorsäure auf die Zahl und die Lokalisation der Markierungen untersucht. Diese obengenannten Befunde stehen im Gegensatz zu den von Lemperle et al. (1970) veröffentlichten Resultaten. Die Autoren finden

keine Markierungen in den Glomeruli, den Blutgefäßen und in den Lumina der Tubuli. Die Markierung der Zellkerne beträgt nach 30 Minuten Perfusionsdauer 40 % und dies des Cytoplasmas 80 %⁺. Die starke Markierung des Cytoplasmas und der Zellkerne durch Nukleinsäuren sollte nach Lemperle (1971) ein Hinweis dafür sein, daß empfängerspezifische Nukleinsäuren nach dem Eindringen in die Zellen des Spenderorgans zur Produktion von Histokompatibilitätsantigenen des Empfängers führen. Diese Hypothese kann insofern als nicht zutreffend betrachtet werden, da es in der Zwischenzeit gelungen ist auch für unspezifische Nukleinsäuren einen immunsuppressiven Effekt nachzuweisen (Largadér et al., 1971, Sollinger et al., 1972). Ferner wären auch nach der Produktion von Empfängerhistokompatibilitätsantigenen die ursprünglichen Antigene des Empfängers noch vorhanden und könnten in vollem Umfang erkannt werden. Die von uns festgestellte Markierung der Gefäßwände und die damit mögliche Maskierung von Antigenen steht in keinem Widerspruch zu den Resultaten bei der Verwendung von unspezifischen Nukleinsäuren und gewinnt auch durch die Befunde der extrakorporalen Perfusion mit Hundeblut an zunehmender Wahrscheinlichkeit.

Wirkung natürlicher Nukleinsäuren auf die graft-versus-host-Reaktion.

Werden immunkompetente lymphoide Zellen eines Spendertieres auf einen Empfänger übertragen, der aufgrund verschiedener Maßnahmen (Bestrahlung, neonatale Thymektomie, Immunsuppressiva) zu keiner Immunreaktion fähig ist, so überleben die übertragenen Zellen und erkennen die Histokompatibilitätsantigene des Empfängers. Statt der normalen Transplantatreaktion tritt der umgekehrte Fall der "graft-versus-host"-Reaktion ein. Bei Nagetieren kommt es zur Hemmung des Wachstums (runting disease), einer Vergrößerung der Milz und einer hämolytischen Anämie. Neben den oben genannten Maßnahmen zur Unterdrückung der Immunantwort ist es auch möglich, parentale Zellen auf F-1 Hybriden zu übertragen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Kombination von C3H und DBA Mäusen hat sich bezüglich der Quantifizierung der "graft-versus-host"-Reaktion besonders bewährt (Simonsen, 1964). Die graft-versus-host Reaktion ist möglich, weil die übertragenen C3H Zellen der Mutter die genetische Information (DBA) des Vaters in den F-1 Hybriden erkennen, diese jedoch wegen ihrer genetischen Information (C3H x DBA) gegenüber C3H Zellen nicht reagieren. Simonsen (1963) konnte nachweisen, daß die Stärke der graft-versus-host-Reaktion durch Zunahme des Milzgewichtes bestimmt werden kann. Die Unterschiede im Milzgewicht zeigen sich am deutlichsten, wenn die lymphoiden Zellen zwei bis fünf Tage alten F-1 Hybriden übertragen werden und die Milz neun Tage später entnommen wird.

Um Unterschiede im Körpergewicht der F-1 Hybriden auszugleichen, wird als Wert der Milzvergrößerung das relative Milzgewicht (Milzgewicht/Körpergewicht) angegeben. Der sog. Milzindex wird aus dem Quotienten des relativen Milzgewichtes behandelter Tiere zu dem unbehandelter Tiere errechnet.

$$(\text{Milzindex}) = \frac{(\text{Milzgewicht: Körpergewicht}) \text{ behandelter Tiere}}{(\text{Milzgewicht: Körpergewicht}) \text{ unbehandelter Tiere.}}$$

Die Milzvergrößerung im Ablauf einer graft-versus-host Reaktion wird damit erklärt, daß sich ein Teil der injizierten Zellen in der Milz ablagert, und es dort zu einer Erkennung der Histokompatibilitätsantigene kommt. Wenige Stunden nach diesem Prozeß transformieren sich die Zellen in große pyroninophile Blasten, die eine starke DNA Synthese aufweisen. Nach zwei bis vier Tagen kommt es zur Zellteilung und wiederholter Transformation (Gowans, 1962). Aus Untersuchungen von Gowans (Gowans et al., 1962) war bekannt, daß hauptsächlich kleine Lymphocyten an der Ausbildung einer graft-versus-host Reaktion beteiligt sind. Eine nähere Analyse (Miller und Osoba, 1967) erbrachte Aufschluß darüber, daß es sich hierbei um T Lymphocyten handelt. Diese Befunde standen in Einklang mit der Beobachtung, daß Kinder mit Di George Syndrom, nackte Mäuse oder sog. B Mäuse (neonatal thymektomiert, bestrahlt und mit Knochenmark resubstituiert) niemals eine graft-versus-host Reaktion entwickeln. In Analogie hierzu reduziert die Behandlung von Mäusen mit Anti-theta Serum und Komplement die Ausbildung einer graft-versus-host Reaktion (Radt et al., 1974).

Eine Kooperation von T und B Zellen im Ablauf der graft-versus-host Reaktion konnte ausgeschlossen werden (Hilgard 1970; Bennet, 1972). Die Autoren wiesen nach, daß die Stärke der graft-versus-host Reaktion ausschließlich von der Anzahl der übertragenen T Zellen abhängt, während verschieden Anteile an B Zellen keinen Einfluß hatten.

In der Gruppe 33 wurde Bäckerhefe-RNA 24 Stunden vor der Entnahme der Milzzellen den C3H Spendermäusen injiziert. Hierdurch werden die Zellen in ihrer Reaktionsfähigkeit in der graft-versus-host-Reaktion nicht beeinflusst. In Abb. 7 ist dargestellt, daß sich die Milzindices bei allen drei verwendeten Zellmengen nicht unterscheiden. Diese Befunde beweisen gleichzeitig, daß die Bäckerhefe nach intraperitonealer Injektion in C3H Mäuse die normale Proliferation von Milzzellen nicht beeinflusst, also Toxizität der RNA ausgeschlossen werden kann.

Nach dreistündiger Inkubation der Milzzellen in Bäckerhefe-RNA vor der intraperitonealen Injektion in die F-1 Hybriden wurde eine signifikante Reduktion der Milzgewichte und damit der Milzindices beobachtet (Gruppe 34, Abb. 8). Werden die Zellen nach der Inkubation gewaschen, so ist diese Reduktion der Milzgewichte nicht mehr feststellbar (Gruppe 35, Abb. 9). Aus diesen Befunden geht hervor, daß RNA Moleküle, wenn sie sich, was nach dreistündiger Inkubation angenommen werden kann, an die Oberflächen von Milzzellen anlagern, die Ausbildung einer graft-versus Reaktion reduzieren. Hierbei scheint es sich um eine

lokale Reaktion zu handeln, denn die intraperitoneale Injektion von RNA hat keinen Einfluß auf die Stärke der graft-versus-host Reaktion (Abb. 7). Allerdings ist es auch denkbar, daß nur ein geringer Bruchteil der injizierten RNA die Milzzellen erreicht. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß die RNA-Moleküle durch Sponderribonukleasen gespalten werden. Sollte allerdings der lokale Einfluß von besonderer Bedeutung sein, so können folgende Mechanismen diskutiert werden. Erstens wäre es denkbar, daß RNA-Moleküle die lymphocyten-definierten Antigene der C3H Mäuse maskieren und es somit zu keiner Antigenerkennung kommt.

Die zweite Möglichkeit ergibt sich aus den Resultaten neuerer Untersuchungen von Lfferty und Talmadge (1975, persönliche Mitteilung). Die Autoren konnten nachweisen, daß lymphocyten-definierte Antigene (LD) zwar wesentlich für die Erkennung zellulärer Antigene sind, daß aber ein zweites Signal nötig ist, um die Zelle zur Proliferation anzuregen. Überträger dieses zweiten Signals sind mit sehr großer Wahrscheinlichkeit Transferribonukleinsäuren die von der Stimulatorzelle nach Vorgang der lymphocyten-definierten Antigenerkennung freigesetzt werden. Die Ergebnisse in Gruppe 3⁴ könnten dann folgendermaßen interpretiert werden. Bäckerhefe-RNA lagert sich an die Rezeptoren der Transfer-RNA an, ist aber aufgrund ihrer unspezifischen Struktur nicht in der Lage den Impuls für das zweite Signal auszulösen. Der Verfasser kann im Augenblick über eigene vorläufige Befunde berichten, die im Immunobiology Research Center in Madison (USA) durchgeführt wurden und in welchen es gelang, die

Stimulationsrate in der gemischten Lymphocytenkultur durch Zugabe von Ribonuklease ins Inkubationsmedium deutlich zu verringern.

Ob die oben genannten Befunde von Lafferty und Talmadge, sowie die eigenen vorläufigen Resultate dazu beitragen, können das Prinzip der immunsuppressiven Wirkung von Nukleinsäuren aufzuklären, kann erst durch eine Reihe weiterer Experimente geklärt werden.

Zusammenfassende Darstellung der immunsuppressiven Wirkung
von natürlichen Nukleinsäuren.

Die Verwendung von Nukleinsäuren zählt bislang zur einzigen Methode der Transplantatkonkonditionierung, welche eine erfolgreiche klinische Anwendung erlangt hat. Ursprünglich war mit diesem Vorgehen jedoch nicht die unspezifische Konditionierung eines Transplantates, sondern die Induktion einer spezifischen Immuntoleranz beabsichtigt. Ashley und Axelrod gelang es 1959 durch intrakardiale Injektion von DNA und RNA in schwangere Ratten, Toleranz bei den neugeborenen Tieren zu erzeugen. Axelrod und Lowe berichteten 1961, daß die Überlebenszeit von Rattenhaut in allogenen Systemen durch Vorbehandlung des Spenders mit Extrakten von mikrosomaler RNA verlängert werden kann. RNA aus der zytoplasmatischen Fraktion erwies sich als ineffektiv. Mannick und Edgahl (1964) konnten diese Ergebnisse aus bislang ungeklärten Gründen nicht bestätigen. Ferner konnte durch intravenöse Injektion von RNA aus Leber und Lymphknoten keine Verlängerung von allogenen Hauttransplantaten bei Kaninchen erzielt werden. Eine Inkubation der Hauttransplantate wurde nicht durchgeführt. Durch dieses Vorgehen gelang es Jolley et al. (1961) die Überlebenszeit im gleichen System zu verlängern. Lemperle (1968) prüfte den Effekt von DNA und RNA am Modell der allogenen Ohrhauttransplantation bei Mäusen. Die deutlichste Verlängerung der Überlebenszeit wurde dann erreicht, wenn die Spenderhaut 3 Stunden bei

20° C in DNA bzw. RNA inkubiert wurde. Die optimale Konzentration der Nukleinsäuren betrug 7,5 mg/ml NaCl. Nukleinsäuren aus der Haut waren wirksamer als aus Leber oder Milz.

In gemeinsamen Untersuchungen mit Herrn Priv. Doz. Herrn Bohmert konnte die Überlebenszeit von fetaler Kalbshaut bei Kaninchen durch Inkubation in RNA aus Organen fetaler Kälber von 12,5 auf 25,2 Tage gesteigert werden (Bohmert et al., 1972). Ermutigt durch diese Resultate wurden bislang 38 Patienten mit großflächigen drittgradigen Verbrennungen mit in RNA inkubierter fetaler Kalbshaut behandelt. Während unbehandelte Kalbshaut bereits nach wenigen Tagen nekrotisch wurde und deshalb entfernt werden mußte, konnte die in RNA inkubierte Haut bis zu 21 Tagen die Funktion als temporärer Hautersatz erfüllen (Bohmert, 1972).

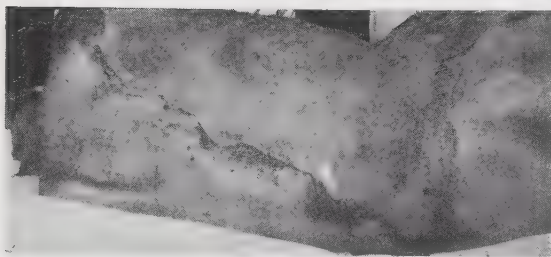


Abb. 17:

21jähriger Patient mit großflächiger drittgradiger Verbrennung der seitlichen Rückenpartie nach der erstmaligen Transplantation von fetaler Kalbshaut.

Experimente welche die Wirksamkeit von Nukleinsäuren bei Nierentransplantationen prüfen sollten, wurden erstmals 1968 von drei Arbeitsgruppen durchgeführt (Lemperle et al., Groth et al., Largadiér et al.). In allen Untersuchungen wurden Hundenieren allogenen transplantiert; eine Typisierung nach Leukozytenantigenen wurde in keinem Fall vorgenommen. Jolley et al. verwendeten autologe oder allogene RNA. Vor der Transplantation wurden die

Nieren mit Ringerlösung und RNA bei 5° Celsius perfundiert. Die besten Resultate wurden erreicht, wenn zum Perfusionsmedium DEAE-Dextran hinzugefügt wurde. Da diese Substanz die Zerstörung der RNA durch Ribonukleasen verzögert, kann aus diesen Befunden geschlossen werden, daß auch bei der Nierentransplantation die immunsuppressive Wirkung von der intakten Struktur der RNA abhängig ist. Unter den oben angeführten Bedingungen lag die maximale Überlebenszeit bei 123 Tagen. Largadiér et al. (1968) verwendeten Nukleinsäuren aus der Milz des prospektiven Empfängers. Die Perfusion wurde in Normo- und Hypothermie durchgeführt. Von zehn Hunden überlebten drei mehr als 14 Tage. Ein Tier hatte eine gute Nierenfunktion über 48 Tage. In einer später durchgeführten Versuchsreihe mit Hefe-RNA (1970) betrug die maximale Überlebenszeit sogar 194 Tage. Sechs von zwanzig Hunden überlebten mehr als 14 Tage.

Lemperle et al. konnten bei Verwendung von empfängerspezifischen Nukleinsäuren eine mittlere Überlebenszeit von 19,5 Tagen erreichen.

Die bislang einzige Mitteilung über die Behandlung von Herztransplantaten mit RNA stammt von Largadiér und Mitarbeitern (1971). Die Herzen von jungen Bastardhunden wurden zehn Minuten in Normothermie in Hefe-RNA inkubiert und anschließend in Hypothermie perfundiert. Die Transplantation erfolgte heterotop auf splenektomiert Empfänger. Die mittlere Überlebenszeit der behandelten Tiere betrug 9 Tage (Kontrolle 5 Tage), die

maximale Überlebenszeit 24 Tage (Kontrolle 14 Tage). Eine sehr interessante Versuchsanordnung wurde von Lemperle et al. (1970) benutzt, um die Funktionszeit von Myocardstückchen zu untersuchen. An Abwandlung der von Fulmer 1963 angegebenen Technik wurden Teile fetaler Mäuseherzen in subkutane Ohrtaschen H-2 inkompatibler Mäuse transplantiert. Funktionierende Transplantate zeigen eine deutliche Pulsation und elektrische Aktivität. Die Behandlung der Spenderherzen erfolgte durch Inkubation in RNA-Lösung. Die Funktionszeit der in Nukleinsäurelösung inkubierten Transplantate betrug 13 Tage, die der Kontrollgruppe 10 Tage.

In neueren Untersuchungen von Scharovsky et al. (1973) konnte nachgewiesen werden, daß durch Vorbehandlung mit isogener RNA die Funktionszeit von Ovarallotransplantaten bei Ratten von 181 auf 451 Tage verlängert wird. Die Funktion des Transplantates wurde durch Vaginalabstriche und Bestimmung des Uterusgewichtes kontrolliert.

Colmenauer und Mitarbeiter (1973) konnten diese Ergebnisse in anderen Testsystemen weitgehend bestätigen. Durch Vorbehandlung von Balb/c Mäusen mit isogener RNA im Zeitraum von 1-5 Tagen vor der Applikation kam es zu einer deutlichen Suppression der Immunreaktivität der behandelten Tiere. Diese drückte sich dadurch aus, daß nach Übertragung von Tumorzellen ein beschleunigtes Wachstum der Tumoren und ein früherer Tod der Tiere festgestellt werden konnte.

Diskussion zum Teil B.

Einfluß von synthetischen Polynukleotiden auf die Immunantwort.

1. Grundsätzliches.

Die ersten Berichte über die Verwendung von synthetischen Polynukleotiden als immunologische Adjuvantien stammen von Braun und Nakano (1967). Die Experimente, die sie zur Verwendung dieser Substanzen veranlaßt haben, wurden bereits 1956 von Merrit und Johnson durchgeführt. Die Autoren konnten beobachten, daß durch den cytotoxischen Effekt von Endotoxin intracelluläres Material freigesetzt wurde, welches benachbarte Zellen zur Proliferation und Bildung von Antikörpern stimulierte. Durch weitere Untersuchungen gelang es nachzuweisen, daß es sich bei den wirksamen Substanzen um Ribonukleinsäuren handelt. Allerdings ließen sich bislang aus noch unbekannten Gründen natürliche Nukleinsäuren nicht als Adjuvantien verwenden. Die gemeinsame Injektion von natürlichen Nukleinsäuren mit verschiedenen Antigenen führte zu keiner gesteigerten Immunantwort. Ein Grund hierfür liegt wahrscheinlich darin, daß natürliche Nukleinsäuren in vivo durch Nukleasen sehr schnell abgebaut werden. Daraufhin wurden einsträngige Polynukleotide wie Poly A, Poly U, Poly C und Poly I getestet. Als auch mit diesen Substanzen keine Steigerung zu erreichen war, wurden in einem letzten Versuch doppelsträngige Polynukleotide wie Poly I:C und Poly A:U verwendet. Hierbei kam es zu einer deutlichen Steigerung der Antikörperbildung.

Im Vergleich zu kompletten Freundschens Adjuvans konnten durch synthetische Polynukleotide ähnliche hohe Titer an präzipitierenden Antikörpern gegen synthetische Polypeptide wie (T, G)-A-L induziert werden. (Sela, unveröffentlichte Mitteilung). Johnson und Mitarbeiter (1970) berichteten über eine deutliche Steigerung der Antikörperbildung gegen Rindergammaglobulin (BGG) durch synthetische Polynukleotide.

Wirkung synthetischer Polynukleotide auf die allogene Transplantatreaktion.

Im ersten Versuch wurde in Analogie zu den im Teil A durchgeführten Experimenten (Tabelle 1) der Effekt von synthetischen Nukleinsäuren auf die allogene Transplantatreaktion untersucht. Hierbei zeigte sich, daß durch die Inkubation der Hauttransplantate oder durch die kombinierte Inkubation und Injektion mit synthetischen Polynukleotiden die Überlebenszeit der Hauttransplantate gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant verändert wird (Tabelle 4). Werden die Polynukleotide jedoch 12 Stunden vor der Transplantation injiziert, so kommt es bei der Behandlung mit Poly I:C zu einer signifikanten Verlängerung, während die Injektion von Poly A:U keinen Effekt zeigt (Tabelle 5). Werden den Empfängertieren am Tag 1, 3, 5 nach der Transplantation synthetische Nukleinsäuren und Antithymocytenserum injiziert, so wird sowohl bei der Verwendung von Poly I:C als auch von Poly A:U die durch ATS bewirkte Verlängerung der Überlebenszeit aufgehoben (Tabelle 6).

Die in Tabelle 4 und 5 dargestellten Resultate schienen zunächst widersprüchlich und schwer interpretierbar. Aufgrund der bekannten Adjuvanswirkung von synthetischen Polynukleotiden wäre eine Verkürzung der Überlebenszeit zu erwarten gewesen. Möglicherweise heben sich jedoch bei der Hauttransplantation zwei einander entgegengesetzt gerichtete Mechanismen auf. Einerseits könnte wie im

Fälle der natürlichen Nukleinsäuren eine Maskierung von Antigenen wirksam werden, andererseits könnte diesem Effekt gleichzeitig durch eine verstärkte Stimulation des Immunsystems entgegengewirkt werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß es in dem verwendeten System auch durch Anwendung von Adjuvantien nicht möglich ist das Immunsystem so stark zu stimulieren, daß eine Überlebenszeit von ca. 10 Tagen unterschritten wird. Auch anderen Untersuchern (Floersheim, 1972; Cone und Johnson, 1971) ist es nicht gelungen, die Überlebenszeit von Hauttransplantaten bei verschiedenen Versuchstieren durch Behandlung mit synthetischen Polynukleotiden zu verkürzen. In Gruppe 40 und 41 wurde den Empfängertieren 12 Stunden vor der Transplantation Poly I:C bzw. Poly A:U intraperitoneal injiziert. Hierbei konnte in der Gruppe 40 (Behandlung mit Poly I:C) eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit beobachtet werden. Die Überlebenszeit der Hauttransplantate der mit Poly A:U behandelten Tiere war gegenüber den Kontrollen nicht verlängert. Ähnliche Resultate wurden von anderen Gruppen am Modell der allogenen Hauttransplantation bei Mäusen berichtet (Fisher et al., 1972; Kreider und Benjamin, 1972). Die Autoren betonen, daß dieser Effekt nur dann erzielt wird, wenn Poly I:C in einem Zeitraum von 12 - 48 Stunden vor der Transplantation injiziert wird. Nach der Vorbehandlung mit Poly A:U im selben Zeitraum kam es nie zu einer Verlängerung der Überlebenszeit. Da sich Poly I:C und Poly A:U in ihrer biologischen Wirkung nur dadurch unterscheiden, daß Poly I:C im Gegensatz zu Poly A:U ein starker Interferoninduktor ist lag die Vermutung nahe,

daß durch die Induktion oder die Anwesenheit von Interferon die spezifische Immunreaktivität der Empfängertiere abgeschwächt wird. Diese Annahme wurde dadurch unterstützt, daß andere Untersucher (De Somer et al., 1967; Mabraten et al., 1973) nachweisen konnten, daß nach Behandlung mit Interferon-induktoren (Newcastle disease Virus, Statalon, Tiloron) die Antikörperbildung gegen Schafer erythrocyten und die Transplantatreaktion abgeschwächt ist.

In Gruppe 42 und 43 wurden die Empfängertiere mit synthetischen Polynukleotiden und Antithymocyten serum behandelt. Hierbei zeigte sich, daß durch diese Behandlung der immunsuppressive Effekt von ATS völlig aufgehoben wird. Diese Befunde erscheinen insofern erstaunlich, als in vorangehenden Untersuchungen die alleinige Injektion von synthetischen Polynukleotiden zu keiner Verkürzung der Überlebenszeit geführt hat. Dies kann unter Umständen wie bereits erwähnt, darauf beruhen, daß in dem verwendeten System die Überlebenszeit der Transplantate nicht unter einer bestimmten Zeit liegen kann. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß Polynukleotide dann besonders wirksam sind, wenn die natürliche Immunreaktivität unterdrückt ist. So konnten Cone und Johnson (1970) nachweisen, daß die Auswirkungen der neonatalen Thymektomie bei Mäusen durch die Behandlung mit synthetischen Polynukleotiden vollständig vermieden werden können. Ferner konnte gezeigt werden, daß die supprimierte Antikörperbildung von ATS

behandelten Mäusen durch die Injektion von Polynukleotiden wieder auf Normalwerte gesteigert werden konnte. Mozes et al. (1970) gelang es durch Applikation von synthetischen Polynukleotiden eine normale Immunantwort gegen das Polypeptid (T,G) - Pro-L in "low responder"-Mäusen zu erzeugen. Die Immunantwort gegen dieses Polypeptid wird vom Ir-3 Gen, das nicht H-2 assoziiert ist kontrolliert. Ir Produkte sind nach Ansicht zahlreicher Autoren für die Expression von T Zell Rezeptoren verantwortlich.

Da die oben genannten Befunde und Resultate der eigenen Untersuchungen dafür sprechen, daß synthetische Polynukleotide einen stimulierenden Einfluß auf T Zellen haben, wurde in den Versuchen 44 - 46 der spezifische Einfluß von Poly I:C und Poly A:U auf eine ausschließlich T-Zell abhängige Reaktion untersucht.

Steigerung der graft-versus-host Reaktion durch synthetische Polynukleotide.

In der Diskussion über den Einfluß von natürlichen Ribonukleinsäuren auf die graft-versus-host Reaktion wurden bereits die grundlegenden Prinzipien erläutert. Es wurden ferner die Hinweise aufgeführt, die dafür sprechen, daß die graft-versus-host Reaktion eine ausschließliche T Zell abhängige Reaktion ist.

Vorbemerkend zu diesem Kapitel sei erwähnt, daß die Bezeichnung Stimulation von T Zellen oder Aktivierung von T Zellen dann gewählt wurde, wenn es sich um Befunde handelt, in welchen T Zell abhängige Reaktionen gesteigert werden. Dieser unspezifische Überbegriff wurde deshalb gewählt, weil bislang über den eigentlichen Mechanismus, über welchen synthetische Polynukleotide T Zell abhängige Reaktionen steigern nichts bekannt ist. In den Gruppen 44 und 45 (Abb. 10 und 11) wurden die Versuchstiere 24 Stunden vor der Entnahme der Milzzellen mit synthetischen Polynukleotiden behandelt. In drei verschiedenen Zellkonzentrationen kam es zu einer signifikanten Steigerung der graft-versus-host Reaktion. Um auszuschließen, daß mit den Milzzellen Übertragene Polynukleotidmoleküle zu einer unspezifischen Splenomegalie führen wurde in Gruppe 46 den Versuchstieren Poly I:C bzw. Poly A:U direkt in die Bauchhöhle injiziert.

Hierbei konnte keine Vergrößerung des Milzindex gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden (Abb. 12). Aus den Resultaten kann geschlossen werden, daß zumindest eine der Adjuvans-Wirkungen von synthetischen Polynukleotiden durch eine in ihrem molekularen Mechanismus noch unbekannte Aktivierung von T Zellen bedingt ist. Die Möglichkeit, daß Polynukleotide aufgrund ihrer Eigenschaften als B Zell Mitogene die Empfänger oder Spenderzellen zu einer unspezifischen Proliferation anregen, lies sich durch den Kontrollversuch bei direkter Applikation in die F-1 Hybriden widerlegen. Ferner erscheint es unwahrscheinlich, daß der Gehalt an Polynukleotidmolekülen der dreimal gewaschenen Spenderzellen noch zu einer Mitogenwirkung ausreicht. Der Nachweis der spezifischen Mitogenwirkung von synthetischen Polynukleotiden auf B Zellen von Mäusen (Scher et al., 1973) kann andererseits als Gegenargument für eine unspezifische Proliferationssteigerung von T Zellen angeführt werden. Nach Bach (Bach F.H. und Bach M.L. 1973) gibt es eine Reihe von Hinweisen die dafür sprechen, daß es sich bei der graft-versus-host Reaktion um ein in vivo Korrelat der gemischten Lymphocytenkultur handelt. In beiden Fällen ist die Proliferation durch antigenerkennende T Zellen bedingt, und wird durch lymphocytendefinierte Antigene (LD Antigene) kontrolliert. Eine Steigerung des Thymidineinbaues in der MLC durch synthetische Polynukleotide (Friedman et al., 1969; Levy et al. 1972; Graziano et al., 1974) kann als Bestätigung der T Zell aktivierende Wirkung von synthetischen Polynukleotiden interpretiert werden. Die Proliferation von Lymphocyten

kann durch synthetische Polynukleotide wie im Falle der MLC durch zelluläre oder auch durch lösliche Antigene (PPD, Mumpsantigene, Tetanustoxoid) gesteigert werden (Graziano et al., 1974). Wesentlich ist hierbei, daß synthetische Polynukleotide allein nicht zu einer Steigerung des Thymidineinbaues führen. Hieraus kann geschlossen werden, daß synthetische Polynukleotide nur bei gleichzeitiger Anwesenheit des Antigens wirksam sind, also spezifische immunologische Reaktionen unterstützen. Die Steigerung des Thymidineinbaues nach der Stimulation mit dem Antigen könnte praktische Anwendung in der Erhöhung der Empfindlichkeit der MLC und der Erkennung von schwachen Tumorantigenen in vitro finden.

Antikörperbildung gegen T Zell abhängige Antigene.

Schaferythrocyten sind T Zell abhängige Antigene (Feldmann et al., 1974). Nackte Mäuse (nu/nu) und T Zell verarmte Mäuse sind zu keiner Antikörperbildung gegen Schaferythrocyten fähig. In vitro kann die Antikörperbildung gegen Schaferythrocyten durch Behandlung mit Anti-theta Serum und Komplement verhindert werden. Diese Voraussetzung wurde in den beschriebenen Versuchen genutzt, um den Einfluß von Polynukleotiden auf eine T Zell abhängige Immunreaktion zu untersuchen.

In den Abb. 13 und 14 ist dargestellt, daß es durch die gemeinsame Injektion von Schaferythrocyten und Polynukleotiden zu einer hoch signifikanten Steigerung der Anzahl antikörperbildender Zellen kommt. Das Maximum der Antikörperbildung liegt bei 4 Tagen. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe findet sich bei den mit Polynukleotiden behandelten Tieren ein deutlich früherer Anstieg der Antikörperbildenden Zellen. Es kann daher vermutet werden, daß der Vorgang der Antigenerkennung durch Polynukleotide über eine Stimulation von T Zellen beschleunigt und verstärkt wird. Im Gegensatz zur graft-versus-host Reaktion (in welcher eine erhöhte T Zell Proliferation stattfindet), kann die verstärkte Immunantwort im hier verwendeten Jerne-System nicht absolut sicher auf einen direkten Einfluß von Polynukleotiden zurückgeführt werden. Nimmt man, daß Polynukleotide ähnliche Eigenschaften wie

TR-(T cell replacing) Faktoren haben, so könnte die Immunantwort über direkte Einflüsse auf die antikörperproduzierenden B Zellen gesteigert werden. Eine weitere Möglichkeit könnte darin bestehen, daß sich das Antigen mit den polymeren Strukturen der synthetischen Polynukleotide in einer Weise komplexiert, daß es zum T Zell unabhängigen Antigen wird. Um diese Fragen zu klären, wäre es nötig, mit nackten Mäusen (nu/nu) oder sog. B Mäusen zu arbeiten. Leider ist es nicht gelungen, diese gegen Infektionen hoch empfindlichen Tiere unter unseren Tierstallbedingungen über den Zeitpunkt der Immunisierung bis zum Testbeginn am Leben zu erhalten. Nach neueren Untersuchungen (Coutinho und Möller, 1974) wäre es auch vorstellbar, daß synthetische Polynukleotide durch ihre Funktion als B Zell Mitogen (Scher et al., 1974) durch Auslösung eines zweiten unspezifischen Signals ohne Hilfe von T Zellen, die B Zelle zur Antikörperproduktion anregen. Die erstgenannten Autoren haben nachgewiesen, daß die Bildung von Antikörpern gegen T Zell abhängige Antigene auch ohne die Anwesenheit von T Zellen möglich ist, wenn das Antigen mit einem B Zell Mitogen appliziert wird. In Gruppe 49 (Abb. 15) wurden die Schaferythrocyten gleichzeitig und 4, 12, 24 und 48 Stunden nach der Injektion von I:C intraperitoneal gespritzt. Hierbei zeigt sich, daß die Anzahl der antikörperbildenden Zellen nach Vorbehandlung reduziert ist, wenn das Antigen zu einem Zeitpunkt appliziert wird an dem der Interferonspiegel des Versuchstieres hoch ist. Diese aufgezeigte

Abhängigkeit der Antikörperbildung von Interferonspiegel läßt vermuten, daß die Bildung von Interferon und Antikörpern Vorgänge sind, die sich gegenseitig beeinflussen. In dem hier verwendeten Behandlungsschema scheint es daß die Bildung von Interferon Vorrang vor der Antikörperbildung hat. Aus diesen Befunden würden sich auch die bereits erwähnten Beobachtung von Gadzar und Mitarbeitern (1972, 1973) erklären lassen. Befunde die für ebenfalls auf ein derartiges Phänomen hinweisen wurden 1970 von De Somer et al. publiziert. Nach der Injektion eines starken Interferoninduktors (Newcastle disease Virus) war die Antikörperbildung gegen Schaferythrocyten in Mäusen signifikant reduziert. Ferner wiesen Mabraten und Mitarbeiter (1973) nach, daß die Immunreaktion gegen Allogtransplantate nach der Behandlung mit verschiedenen Interferon Induktoren (Newcastle disease Virus, Statalon, Tiloron) reduziert ist.

Beeinflussung des Wachstums von malignen Tumoren durch synthetische Polynukleotide.

Die erste Mitteilung über eine erfolgreiche Behandlung von Tumoren mit Poly I:C stammt von Levy und Mitarbeitern (Levy et al., 1969). Durch intraperitoneale oder intravenöse Injektion von 100 µg Poly I:C in dreitägigen Abständen konnte das Wachstum von verschiedenen Tumoren (Retikulozellsarkom, Lymphom, Fibrosarkom, Adenovirustumor) in Mäusen reduziert oder vollständig verhindert werden. Die Behandlung wurde in allen Fällen 12 bis 24 Stunden nach der Inokulation der Tumorzellen begonnen. Unabhängig von diesen Untersuchungen wurden Berichte über eine erfolgreiche Behandlung eines amelanotischen Melanoms in C-57 Mäusen (Bart und Kopf, 1969) und eines virusinduzierten Sarcoms in NIH Swiss Mäusen (Sarma et al., 1969) mitgeteilt. Wurden BD-F1 Mäuse mit L-1210 Leukämiezellen infiziert, konnte die Überlebenszeit der Tiere durch Behandlung mit Poly I:C signifikant verlängert werden. (Zeletznick und Bhuyan, 1969). Ein zytostatischer Effekt des Polynukleotids konnte durch Untersuchungen in der Zellkultur ausgeschlossen werden. Diese Befunde wurden von Dodge und Moscovici (Dodge und Moscovici, 1972) insofern bestätigt, als sich kein Unterschied im Wachstum von Tumorzellen in der Kultur vor und nach der Zugabe von Poly I:C feststellen ließ.

Nachdem aus diesen Untersuchungen geschlossen werden konnte, daß Poly I:C keine zytostatische Wirkung auf Tumorzellen ausübt, konzentrierte sich die Diskussion um einen möglichen Wirkungsmechanismus auf zwei Möglichkeiten:

1. Hemmung des Tumorwachstums durch Poly I:C induziertes Interferon.
2. Stimulation der Immunreaktion gegen Tumorantigene.

Für die erste Hypothese sprach vor allem die Tatsache, daß besonders virusinduzierte Tumoren erfolgreich mit Poly I:C behandelt werden konnten (Levy et al., 1972). Es lag also nahe, zu vermuten, daß die Replikation von Tumoviren durch eine interferonbedingte Hemmung der Translation verhindert wird. Ferner konnte nachgewiesen werden (Gresser et al., 1967; Levy et al., 1971), daß gereinigte Interferonpräparationen ebenfalls das Tumorwachstum reduzieren. Allerdings lag die Wirksamkeit von Poly I:C weit über diesen Präparationen was einerseits ein Hinweis für die größere Effektivität von endogen induziertem Interferon sein könnte, andererseits aber auch für zwei verschiedene Mechanismen oder eine zusätzliche Wirkung von Poly I:C in vivo spricht. Bestätigend für diese Annahme kann hinzugefügt werden, daß Interferon und Poly I:C in der Zellkultur die Fokusbildung durch Moloney Sarkomviren zwar in gleichem Maße hemmen, in vivo aber die Überlebenszeit von tumortragenden Tieren durch Poly I:C wesentlich stärker verlängert wird als durch Interferonpräparationen (Levy et al., 1971).

Diese Ansicht wird auch durch die eigenen Befunde beim virus-induzierten A-Mel 3 bestätigt. Die stark interferoninduzierenden Substanzen Poly I:C und M-HP (Mayr, 1974) hemmen das Wachstum der Tumorzellen in einem höheren Maß als Poly A:U das nur schwach Interferon induziert.

Die zweite Möglichkeit, daß Polynukleotide durch die Stimulation des Immunsystems wirksam werden, lag insofern nahe, als seit mehreren Jahren bekannt war, daß synthetische Polynukleotide vorzügliche Adjuvanseigenschaften besitzen. Neben einer Steigerung der Phagocytose (Johnson et al., 1971) und der Antikörperbildung (Braun et al., 1971) konnte nachgewiesen werden, daß Polynukleotide auch zelluläre Immunreaktionen steigern.

Die Steigerung des Milzgewichtes in der graft-versus-host Reaktion (Gruppe 36, u.37) und die vermehrte Bildung von antikörperbildenden Zellen gegen Schafererythrocyten (Gruppe 47 u.48) sind beweisend dafür, daß Polynukleotide thymusabhängige Immunreaktionen verstärken. Diese Tatsache ist insofern von Bedeutung als bekannt ist, daß T-Zellen eine wesentliche Funktion bei der Erkennung von Tumorantigenen und als Vorstufen der sog. Killerzellen ausüben. Antigenerkennende T_1 Zellen führen durch direkten Zellkontakt oder über lösliche Mediatorsubstanzen dazu, daß eine weitere T Zellsubpopulation, die T_2 Zellen, zu zytotoxischen Effektorzellen werden (Wagner und Nossal, 1973).

Weitere Hinweise für die überwiegend immunologische Wirkung von synthetischen Polynukleotiden in der Abwehr von Tumoren sind

durch Resultate gegeben in welchen die protektive Wirkung von Poly A:U derjenigen von Poly I:C gleichkommt. Obwohl Poly A:U ein schwacher Interferoninduktor ist gelang es (Lacour et al., 1972), das Wachstum eines spontan auftretenden Mammacarcinoms in gleichem Maße zu hemmen als mit Poly I:C.

Ähnliche Resultate wurden von Levy et al. (1972) bei der Behandlung des Transplantaten Melanoms T 1196 in Mäusen publiziert. Hinzu kommt, daß auch chemisch oder durch Strahlen induzierte Tumoren (Ball, 1971; Marquard, 1973) erfolgreich mit synthetischen Polynukleotiden behandelt werden konnten. In diesem System muß allerdings solange Zurückhalten geübt werden, solange nicht klar ist, inwieweit Carcinogene und Strahlen nur als Wegbereiter einer viralbedingten Transformation wirken.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion des Tumorstwachstums durch Interferoninduktoren (Poly I:C, M-HP) spricht dafür, daß zumindest auf das amelanotische Hamstermelanom A-Mel 3 bezogen, Interferon das wirksamere Prinzip darstellt, da Poly A:U das Wachstum der Tumoren weniger hemmt. Möglicherweise war aber jedoch die Dosis an Poly A:U zu gering, oder Polynukleotide bewirken beim syrischen Hamster keine der Maus vergleichbare Stimulation der Immunantwort.

Vergleichende Darstellung und Zusammenfassung der Wirkung von natürlichen und synthetischen Nukleinsäuren.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, daß natürliche und synthetische Nukleinsäuren verschiedenartige Wirkungen auf die Immunreaktion haben. Hierbei ist festzustellen, daß nicht in allen Experimenten ein direkter Vergleich zwischen diesen beiden Substanzen angestrebt wurde. Vielmehr ging es dem Verfasser darum durch eine Reihe von einzelnen Experimenten zumindest teilweise den Wirkungsmechanismus dieser Substanzen aufzuklären.

Im Einzelnen konnte nachgewiesen werden:

1. Natürliche Nukleinsäuren verlängern die Überlebenszeit von allogenen und xenogenen Transplantaten.
2. Die immunsuppressive Wirkung ist bedingt durch einen lokalen Einfluß am Transplantat und abhängig von der intakten Struktur der Nukleinsäuren.
3. Natürliche Nukleinsäuren haben keine zentrale Wirkung auf die Immunantwort.

Die Wirkungen synthetischer Polynukleotide können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

1. Synthetische Polynukleotide haben keinen lokalen Einfluß auf Hauttransplantate. Die Überlebenszeit wird nur dann verlängert wenn die Substanzen 12 Stunden vor der Transplantation injiziert werden.

2. Synthetische Polynukleotide heben den immunsuppressiven Effekt von Antithymocytenserum auf.
3. Synthetische Polynukleotide steigern die graft-versus-host Reaktion und die Antikörperbildung gegen ein T-Zell abhängiges Antigen.

Die Frage worauf die unterschiedliche Wirkung von natürlichen und synthetischen beruht, kann bislang noch nicht beantwortet werden. Hierzu werden weitere biochemische und membranphysiologische Untersuchungen nötig sein.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ASHLEY, F.L., MCNALL, E.G., DUTT, N.R., GRACIA, E.N.,
SLOAN, R.F.:
The effects of nucleic acids on homograft
tolerance.
Ann.N.Y. Acad. Sci. 87: 429-444 (1966)
2. ASKONAS, B.A., BRENT, L., GOWLAND, G., RUSZKIEWICZ, M:
Failure to change the antigenicity of
skingrafts by incubation with allogeneic
RNA.
Nature 212: 1257-1258 (1966).
3. AXELROD, A.E., LOWE, M:
Effect of ribonucleic acid extracts upon
viability of skin homografts in the rat.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 108: 549 (1961)
4. BACH, F.H., BACH, Marilyn L.:
Mixed Leukocyte culture an cell-mediated
Lympholysis Assays: Models of allograft
rejection.
MTP, Medical an Technical Publishing co
LTD: (1973)
5. BALL J.K., MC CARTER J.A.:
Effect of Polyinosinic-Polycytidylic Acid
on Induction of Primary or Transplanted
Tumors by Chemical Carinogen or Irradiation
Nat'l. Cancer Res. 46: 1009-1014 (1971)
6. BARON S., DU BUY, H., BUCKLER, C.E., JOHNSON, M.,
WORTHINGTON, M.:
Factor affecting the interferon response
of mice to polynukleotides
Biol. Eff. of Polynucl. 45 Springer Ver-
lag, Berlin (1971)
7. BENDISCH, A., WILCOK, T., BORENFREUND, E.:
Penetration of DNA by mamalian cells.
Science 148, 374 (1965)
8. BENNETT, M.,: The lymphocytic response to grafting.
Cell. Immunol., 3: 531 (1972).

9. BOHMERT, H., SEINFELD, H., BRENDDEL, W., SOLLINGER H.W., CHAUSSY, C.:
Fetale Kalbshaut und Nukleinsäuren zur temporären Deckung großflächiger Verbrennungen III. Grades
1. Tagung der Vereinigung der Deutschen Plastischen Chirurgen mit Beteiligung der Österreichischen Gesellschaft für Plastische Chirurgie Sept. 1970 München.
10. BOLLE, A., EPSTEIN, R.H., SALSER, W., E.P. GEIDUSCHE, K:
Preparation of Ribonucleic acid from E. Coli.
J.Mol. Biol. 1968, 31, 325-348 (1968)
11. BRAUN, W., NAKANO, M.:
Antibody formation: Stimulation by polyanalytic and polycytidylic acids.
Science 157: 819-821 (1967)
12. COLMERAUER, M.E.M., RUMI, L., SAAL, F., PASQUALINI, CH.D., RABASA, S.L.:
RNA-Mediated Immunologic Depression.
The J. of Immunology., 111: 743-749 (1973)
13. DE SOUSA, M.A.B., PARROTT, D.M.V., PANTELOURIS, E.M.:
The lymphoid tissues in mice with congenital aplasia of the thymus.
Clin. exp. Immunol., 4: 637 (1969)
14. DODGE, W.H., MOSCOVICI, C.:
Effect of Poly I:C, on Transformation by Rous Sarcoma Virus.
Proc. Soc.Exp. Biol.Med. 139: 1407-1412 (1972)
15. FRIEDMAN, H.M., JOHNSON, A.G., PAN, P.:
Stimulatory effect of polynucleotides on short term leukocyte cultures.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132: 916-918 (1969)
16. GRAZIANO, K.D., LEVY, C.C., SCHMUKLER, M., MARDINEY, M.R.:
Parameters for Effective Use of Synthetic Double Stranded Polynucleotides in the Amplification of Immunologically Induced Tritiated Thymidine Incorporation.
Cellular Immunology: 47-56 (1974)

17. GROTH, C.G., PORTER, K.A., DALOZE, P.M., HUGUET, C., SMITH, C.V., BREITSCHNEIDER, L., STARZL, T.:
Effect of ribonucleic acid perfusion on canine kidney and liver homograft survival. Surgery 64: 31-38 (1968)
18. GOWANS, J.L.: Immunological aspects of transplantation surgery.
Ann. Acad. Sci., 99: 483 (1962)
19. GUTTMANN, R.D., KRAUS, E.D., DOLAN, M.F.:
Rejection of isogenetic murine skin grafts following exposure to allogeneic ribonucleic acid.
Nature 203: 196-198 (1964)
20. HARPER, E.: Die Nukleinsäuren.
Thieme Verlag, Stuttgart (1964)
21. HASKOVA, V., HRUBESOVA, M.,:
Part played by deoxyribonucleic acid in transplantation immunity.
Nature (London) 182: 61-68 (1958)
22. HOLOUBEK, V., HNILICA, L.,:
The failure to produce somatic and immunological changes in inbred AKR mice specific deoxyribonucleic acid.
Canad. J. Biochem. 39: 1478 (1961)
23. HUMPHREY, J.H., WHITE, R.G.,:
Kurzes Lehrbuch der Immunologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1971)
24. JERNE, N.K., NORDIN, A.A., & HENRY, C.,:
The agar plaque technique for recognizing antibody producing cells.
In Cell-bound Antibody. p. 109. Philadelphia: Wistar Institute Press. (1963)
25. JOHNSON, A.G., SCHMIDTKE, J., MERRITT, K., HAN, I.:
Enhancement of antibody formation by nucleic acids and their derivatives.
Nucleic Acids in Immunology: 379-385 Ed. by O.J. Plesciy and W. Braun. Springer-Verlag New York (1968)

26. JOHNSON, A.G., CONE, R.E., FRIEDMANN, H.M., HAN, I.H., JOHNSON, H.G., SCHMIDTKE, J.R., STOUT, R.D.: Stimulation of the immune system by homopolyribonucleotides. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York: 157-177 (1971)
27. JOLLEY, W.B., HINSHAW, D.B., PETERSON, M.: Effect of ribonucleic acid on homograft survival. Surg. Forum 12: 94-100 (1961)
28. JOLLEY, W.B., HINSHAW, D.B.: Basic studies on homograft acceptance including early clinical results. Amer. J. Surg. 112: 308-313 (1966)
29. LAND, W., CORRELL, J., PIELSTICKER, K., BRENDDEL, W.: Renale in vitro-Xenohämoperfusion in verschiedenen Specieskombinationen. Rex.Exp. Med. 159, 276-287 (1973)
30. LEDOUX, L.,: Uptake of DNA by living cells. Progr. Nucleic Acid Res. 4: 321-367 (1965)
31. LEDOUX, L., GERBER, G., CHARLES, P., REMY, J. REMY-DEFRAIGNE, J.: Uptake of labelled DNA by isolated perfused organs. Experientia 23: 16-18 (1967)
32. LEMPERLE, G.,: Prolonged survival of skin allografts after incubation with recipient DNA or RNA. J.Surg. Res. 8: 511-521 (1968)
33. LEMPERLE, G., HAUPTMANN, A., MICHAELIS, W., WIECZOREK, U., GACA, A.: Die Perfusion homologer Nieren mit Nucleinsäuren des Empfängers. Langenbeck's Arch.klin.Chir. 322: 1163-1167 (1968)
34. LEMPERLE, G., KÖHNLEIN, H.E., MENDE, R.,: Prolonged survival of skin allografts after treatment with direct current. Europ. Surg. Res. 1: 50 - 55 (1969)
35. LEMPERLE, G., KOEHNLEIN, H.E., HACKER, J.,: Incubation of Cardiac Tissue with DNA and Transplantation into Allogeneic Mouse Ear 4th Congress of the European Society for Experimental Surgery, Oslo (1970)

36. LEVY, H.B., LAW, D.W., and RABSON, A.S.,:
Inhibition of tumor growth by poly-
inosinic-polycytidylic acid.
Nat'l. Sci. U.S. 62: 357 (1969)
37. LEVY, H.B., ASOFISKY, R., RILEY, F., CARAPIN, A.,
CANTOR, H., ADAMSON, R.,:
The antitumor action of polyinosinic-
polycytidylic acid.
Ann. N.Y. Acad. Sci., in press. (1969)
38. MANNICK, J.A.: Failure of ribonucleic acid to inhibit
rejection of skin homografts.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 116:
1064- 1067 (1964)
39. MARQUARD, H.,: Polyriboinosinic-Polyribocytidylic Acid
prevents Chemically-induced Malignant
Transformation in vitro.
Nature New Biol., 246 Dec. 19/26: 222-
229 (1973)
40. MERRITT, K., JOHNSON, A.G.,:
Studies on the adjuvant action of bacterial
endotoxins on antibody formation. VI. En-
hancement of Antibody formation by nucleic
acids.
J. Immunol., 94: 416 - 422 (1965)
41. MICHIE, D.,: The biometrics of the spleen weight assay.
Cellular Immunology, Vol. 2, (1973),
30.1, Blackwell Scientific Publikations,
Oxford.
42. MOZES, E., SHEARER, G.M., SELA, M., BRAUN, W.:
Regulatory Factors in the Immune Response.
In Biological Effects of Polynucleotides,
R.F. Beers and W.Braun, eds. New York:
Springer-Verlag, p. 197: (1971)
43. SCHAROVSKY, G.O., DLUGOVITZKY, D.G., MORINI, J.C., LONDNER, M.V.:
Prolonged survival of ovarian allografts in
rats pretreated with normal ribonucleic acid.
Transplantation, 15: 3 329-330 (1973)
44. SCHER, I., STRONG, D.M., AHMED, A., KNUDSEN, R.C.,
SELL, K.W.:
Specific Murine B-Cell Activation by Synthethic
Single and Double-Stranded Polynucleotides.
of Exp. Med., 138: 1545-1563 (1973)

45. SCHIMPL, A., WECKER, E.,:
Replacement of T-cell function by a T-cell product.
Nature new. Biol., 237: 15 (1972)
46. SIEBERT, G.: Ribonukleasen
Hoppe, Seyler / Thierfelder's Handbuch der physiologisch- und pathologisch- chemischen Analyse.
10. Aufl. Bd. 6 Springer Berlin-Göttingen-Heidelberg (1964)
47. SIMONSEN, N.: Graft-versus-host reactions. Their natural history and applicability as tools of research.
In Progress in Allergy, Vol. 6, pp: 349 - 467 (1962) Basle: Karger.
48. SOLLINGER, H.W., BRENDDEL, W.,:
Prolonged survival of allogeneic skin grafts in rats by a modified treatment with nucleic acids.
7th Congress of the Society for exp. Surgery, Amsterdam (1972)
49. TRÄBERT, E., LARGIADER, F., WEGMANN, W.:
Verzögerte Abstoßung von Nierenhomotransplantaten nach in vitro-Konditionierung.
Bruns' Beitr. klin. Chir. 217: 160-164 (1969)
50. TRAKATELLIS, A.C., AXELROD, A.E., MONTJAR, M., LAMY, F.:
Induction of immune tolerance with ribosomes and ribonucleic acid extracts in newborn mice.
Nature 202: 154 (1964)
51. UHLSCHMID, G., LARGADER, F.:
Konditionierung von Allotransplantaten mit Ribonucleinsäuren.
Helvetica Chirurgica Acta 1, 2 270-274 (1970)
52. WAGNER, H., RÖLLINGHOFF, M., NOSSAL, G.J.V.:
T-Cell-Mediated Immune Responses Induced in vitro: A Probe for Allograft and Tumor Immunity.
Transplant. Reviews 17: 1-36 (1974)
53. WAGNER, H., RÖLLINGHOFF, M., NOSSAL, G.J.V.:
T-Cell-Mediated Immune Responses Induced in vitro: A Probe for Allograft and Tumor Immunity.
Transplant Reviews 17: 1-36 (1974)

54. WILCZOK, T: Autoradiographic studies on the incorporation of heterologous DNA into the Novikoff hepatoma cells.
Neoplasma 9: 369-378 (1962)
55. WINCHURCH, R., ISHIZUKA, M., WEBB, D., BRAUN, W.:
Regulatory Factors in the Immune Response.
J. Immunol. 106: 1399 (1971)
56. YOON, C.H.: Incorporation of exogenous ribonucleic acid into Nelson's ascites cells in vitro.
Exp. Cell Res. 38: 386-397 (1965)

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. W. Brendel danke ich für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung im Verlauf der Arbeit.

Herrn Prof. K. Meßmer danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Den Herren O. Frisch und E. Roglmeier bin ich für die Betreuung der Versuchstiere zu Dank verpflichtet.

Frau L. Mangold danke ich für die Hilfe bei der Anfertigung des Manuskripts.

LEBENS LAUF

- Geboren: 30. August 1946 in München
- Eltern: Johann Sollinger, städt. Beamter
 Maria Sollinger, geb. Weichselbaumer
- 1953-1958: Volksschule in München - Pasing.
- 1958-1967: Max-Planck Gymnasium in München-Pasing.
- 1967-1973: Medizinstudium in München
- 1973 : Ärztliche Prüfung in München
- 1973-1974: Medizinalassistent an der Chirurgischen Universitätsklinik in München und am Kreiskrankenhaus in Garmisch-Partenkirchen.
- 1974 : Stipendiat im Rahmen der Graduiertenförderung am Institut für Chir. Forschung an der Chirurgischen Universitätsklinik in München.
- 1975 : Postdoctoral Research Fellow am Immunobiological Research Center in Madison (USA)

